

Aus dem Institut für Biologische und Medizinische Bildgebung
des Helmholtz Zentrums München
Vorstand: Prof. Dr. Vasilis Ntziachristos

**Erforschung und Entwicklung
einer fluoreszenzbasierten Bildgebungsmodalität
zur Anwendung in der Onkologie**

Dissertation
zum Erwerb des
Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Saskia Björn

aus
Sinsheim

im Jahr

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Karl-Hans Englmeier
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dirk-André Clevert
Priv. Doz. Dr. Stefan Glasauer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Ralf Schulz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2012

Meiner Familie

Per aspera ad astra.

Zusammenfassung

Die vorliegende kumulative Dissertation besteht aus zwei referierten Veröffentlichungen in zwei der renommiertesten Fachzeitschriften im Bereich der optischen Bildgebung [39]. Das Ziel dieser Arbeit ist die Erforschung und Entwicklung einer fluoreszenzbasierten Bildgebungsmodalität zur Anwendung im Bereich der Onkologie.

Durch die erfolgreiche und fortwährende Entwicklung fluoreszierender Farbstoffe und aktivierbarer Proben, soll eine frühere Diagnose ermöglicht und so die vom Tumorstadium abhängigen Heilungschancen maßgeblich verbessert werden.

In der präklinischen Forschung haben sich Bildgebungsmodalitäten, wie die Epifluoreszenzmikroskopie und Molekulare Fluoreszenztomographie etabliert. Die Epifluoreszenzmikroskopie bietet eine hohe optische Auflösung im Bereich von ca. $0,1\ \mu\text{m}$ bis $100\ \mu\text{m}$, jedoch nur eine geringe Eindringtiefe in das zu untersuchende Objekt von $1\ \mu\text{m}$ bis $100\ \mu\text{m}$. Eine deutlich geringere Auflösung von ca. $1\ \text{mm}$ liefert die Molekulare Fluoreszenztomographie, allerdings kann eine hohe Eindringtiefe von mehreren Millimetern bis Zentimetern erreicht werden. Um Objekte im Bereich des sogenannten "*imaging gap*"* von $100\ \mu\text{m}$ bis zu einigen Millimetern zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine neuartige Bildgebungsmodalität entwickelt - die Mesoskopische Epifluoreszenz Tomographie (MEFT).

Mit der MEFT werden Fluoreszenzverteilungen, die im sichtbaren Wellenlängenbereich emittieren, in biologischem Gewebe dreidimensional rekonstruiert und zugleich werden eine hohe optische Auflösung von bis zu ca. $100\ \mu\text{m}$ und eine große Eindringtiefe von bis zu $10\ \text{mm}$ erfolgreich kombiniert. Die MEFT arbeitet in einer Reflexionsgeometrie und die detektierten Datensätze werden im tomographischen Sinne rekonstruiert. Ein Laserstrahl wird über den gewählten Bildgebungsbereich gerastert und regt Fluorochrome innerhalb des Gewebes an. Zeitgleich werden die reflektierten Fluoreszenzemissionen durch eine CCD-Kamera detektiert.

*deutsch: "Lücke in der Bildgebung"

In der ersten Veröffentlichung wird die MEFT vorgestellt. Die Funktionsweise des neuartigen Systemaufbaus und die Rekonstruktionsmethoden werden detailliert präsentiert. Anhand von Simulations- und Phantomstudien wird gezeigt, dass der Fluoreszenzfarbstoff (3,3'-Diocadecyloxa-Carbocyanin Perchlorat - DiO) in stark streuender und absorbierender Umgebung bis zu einer Eindringtiefe von 10 mm rekonstruiert werden kann. DiO besitzt sehr ähnliche Anregungs- und Emissionswellenlängen wie die grünen Fluoreszenzproteine (GFP), welche häufig in der biologischen und medizinischen Forschung ihre Anwendung finden.

In der zweiten Veröffentlichung liegt der Fokus auf der Weiterentwicklung der MEFT-Methoden und *ex vivo* Daten. Im Detail wird der Einfluss auf Randartefakte durch die Anwendung von erweiterten Gittern mit zusätzlichen Quellpositionen, während der Datenerfassung und Rekonstruktion, untersucht. Des Weiteren wird die große Leistungsfähigkeit der MEFT für die Kleintierbildgebung präsentiert. Mit DiO gefüllte Kapillarröhrchen (Durchmesser 150 μm) wurden in die Beinmuskulatur zweier euthanasierter Mäuse injiziert und es wird gezeigt, dass MEFT den GFP-ähnlichen Fluoreszenzfarbstoff innerhalb von biologischem Gewebe mit einer hohen räumlichen Auflösung bis zu einer Eindringtiefe von 1100 μm detektiert.

Des Weiteren wird ein Ausblick auf neueste Ergebnisse einer *in vivo* Studie gegeben. Menschliche Darmkrebszellen, HCT-116, wurden subkutan in den dorsalen Thorax von Nacktmäusen injiziert. Nach einem Tumorwachstum von zehn bis vierzehn Tagen, wurden die Tiere durch Mikro-Computertomographie, Sonographie und Mesoskopische Epifluoreszenz Tomographie bildgegeben. Zur Validierung der Ergebnisse wurden die Tumorregionen im Anschluss in einem weiterentwickelten Kryotom geschnitten und histologische Präparate angefertigt, die in einem Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden.

Abstract

This dissertation consists of two peer-reviewed papers published in most renowned journals of optical imaging [39]. The main task of this work is the investigation and development of a fluorescence-based imaging technique for applications in oncology.

The successful and enduring development of fluorescent dyes and activatable probes affords earlier cancer detection and therefore improves the patient's recovery, which is mainly dependent on the tumor stage.

Epifluorescence Microscopy and Fluorescence Molecular Tomography are common imaging modalities in pre-clinical research. Epifluorescence Microscopy offers a high optical resolution in the region of approximately $0.1\ \mu\text{m}$ up to $100\ \mu\text{m}$, however the penetration depth in the imaged object is limited to $1\ \mu\text{m}$ up to $100\ \mu\text{m}$. A significantly lower optical resolution of about $1\ \text{mm}$ is achieved by the Fluorescence Molecular Tomography. However, it provides a higher penetration depth of several millimetres up to centimetres. To bridge the so-called "*imaging gap*" in the region of $100\ \mu\text{m}$ up to several millimetres, a novel imaging modality has been developed in this work - Mesoscopic Epifluorescence Tomography (MEFT).

MEFT reconstructs fluorescence bio-distribution in the visible wavelength range with a high optical resolution up to $100\ \mu\text{m}$ and a large penetration depth up to $10\ \text{mm}$. MEFT determines fluorescence bio-distribution by tomographic means in reflectance geometry. A laser beam is scanned over the region of interest to excite fluorophores hidden within the tissue, while a CCD camera acquires images of reflected fluorescence emissions.

The first publication introduces the MEFT system. The functionality of the novel set-up and reconstruction methods are presented in simulation and phantom studies recovering a fluorescent dye (3,3'-di-octadecyloxa-carbocyanine perchlorate - DiO) in a highly scattering and strongly absorbing medium with a penetration depth up to $10\ \text{mm}$. DiO offers similar excitation and emission wavelengths as the green

fluorescence protein (GFP) that is often used in biological and medical research.

The second publication focuses on the enhancements of the MEFT methods and *ex vivo* imaging. The effect of using enhanced source grid arrangements during the data acquisition and the reconstruction process to minimize boundary artifacts is presented and demonstrates the strong potential of MEFT to reconstruct DiO in the case of small animal imaging. Capillary tubes (diameter 150 μm) filled with DiO were injected into the leg muscles of two euthanized mice. We present *ex vivo* data that show high spatial resolution in heterogeneous tissues using GFP-like fluorescence in biological tissue up to a depth of 1100 μm .

Furthermore, an outlook of recent results of an *in vivo* study is shown. Human colon cancer cells, HCT-116, were injected subcutaneously in nude mice. After ten to fourteen days of tumor growth, the animals were imaged by Micro-Computed Tomography, ultrasound and Mesoscopic Epifluorescence Tomography. To validate the results, the tumor regions were sliced in a custom-built cryotome and slices for histological staining were prepared and analyzed in a fluorescence microscope.

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank richtet sich an meinen Doktorvater, Prof. Dr. Karl-Hans Englmeier, und meinen Betreuer, Dr. Ralf Schulz, die meine Vorhaben stets förderten. Vielen herzlichen Dank, Herr Englmeier, für Ihre enorme Unterstützung und dass Sie mir die Rahmenbedingungen boten, mich so gut es ging auf meine Promotion zu konzentrieren. Danke, Ralf, für die Finanzierung des Projekts und für die Diskussionen, sei es über den experimentellen Aufbau, die Rekonstruktionsalgorithmen, oder andere Ideen und Ratschläge.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. V. Ntziachristos, dass ich an seinem Institut für Biologische und Medizinische Bildgebung (IBMI) am Helmholtz Zentrum München promovieren durfte. Jenny, Marcus, Angelique und meinen Bürokollegen, Adrian und Thanos, danke ich für all die gemeinsamen Erfahrungen und den Spaß am Institut und im Privaten.

Mein ausdrücklicher Dank gilt zudem unseren Kooperationspartnern, Prof. Dr. F. Kiessling, Dr. W. Lederle und L. Abou-Elkacem vom Lehrstuhl für Experimentelle Molekulare Bildgebung der RWTH Aachen und Dr. J. Teissié und seiner Gruppe vom Institut der Pharmakologie und Strukturbiologie des CNRS in Toulouse, Frankreich. Sie ermöglichten es, mein entwickeltes System *in vivo* zu testen.

Als Absolventin einer Fachhochschule war meine Promotion an der Medizinischen Fakultät der LMU mit dem Erbringen zusätzlicher universitärer Leistungen verbunden. Mein Dank gilt Frau Hinkelmann, Mitarbeiterin in der Verwaltung der Medizinischen Fakultät der LMU, für ihre freundliche Unterstützung.

Des Weiteren danke ich meiner Familie, die mich nicht nur während meiner Promotion, sondern wo und wann immer sie können, unterstützen. Danke, Michaela und Verena, für Eure Freundschaft, die mich besonders in schweren Zeiten auffängt!

”Last but not least” danke ich Stefan, der mir während der Zeit der Promotion mit Rat und Tat zur Seite stand.

Diese Arbeit wurde finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) unter der Förderungsnummer SCHU-2378.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Abstract	v
Danksagung	vii
1 Einleitung	3
1.1 Systemaufbau	5
1.2 Eingabedaten für die Rekonstruktion	6
1.3 Methodik der Rekonstruktion	7
1.4 Ergebnisse der Rekonstruktion	10
2 Publiizierte Fachartikel	13
2.1 Erste Veröffentlichung	13
2.2 Zweite Veröffentlichung	23
3 Ergebnisse	35
4 Schlussbetrachtung	41
Abbildungsverzeichnis	45
Literaturverzeichnis	47

1 Einleitung

In der medizinischen Diagnostik sind Bildgebungsverfahren, wie die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Sonographie (US), zu unverzichtbaren Bestandteilen geworden. Durch ihre Entwicklung wurde ein maßgeblicher Fortschritt für die moderne Medizin erreicht, indem Patienten "durchleuchtet" werden, um pathologische Prozesse zu detektieren.

In der Onkologie ist es insbesondere wünschenswert tumoröses Gewebe frühestmöglich zu diagnostizieren, da Heilungschancen stark vom Tumorstadium abhängen. Tumore entstehen durch Veränderungen der DNA in einzelnen Zellen, wodurch deren interner Stoffwechsel verändert wird und es zu unkontrollierter Zellteilung kommt. Tumorzellen überschreiten Gewebegrenzen und wachsen in benachbartes, gesundes Gewebe ein [31, 36]. Dies führt schließlich zu Änderungen der Morphologie und dadurch zu einer detektierbaren Tumormasse.

Klassische Bildgebungstechniken ermöglichen die Detektion von morphologischen und funktionellen Abweichungen. Die Tumore haben in diesem Stadium in der Regel bereits eine Größe im Millimeterbereich erzielt [2, 18, 24]. Es gilt neue bildgebende Diagnoseverfahren zu erforschen, welche bereits zellinterne Änderungen detektieren und so eine frühere Diagnose und einen besseren Nachweis von Heilungserfolgen ermöglichen. Könnte innerhalb weniger Tage festgestellt werden, dass ein erwarteter Behandlungserfolg ausbleibt, könnte auf eine alternative Therapie ausgewichen oder gegebenenfalls die Dosis erhöht werden. Bisher ist dies nur eingeschränkt möglich, da detektierbare morphologische Veränderungen oft erst nach Wochen oder gar Monaten sichtbar werden. Die Auswirkungen innerhalb der Zelle treten jedoch bereits wenige Stunden oder Tage nach Behandlungsbeginn auf und können durch die Anwendung von Kontrastmitteln, die den Bildkontrast abhängig von spezifischen Zellprozessen erhöhen, detektiert werden.

Aufgrund der steigenden Verfügbarkeit spezifischer und aktivierbarer Proben, so-

wie genetisch kodierbarer Markersubstanzen, gewinnen fluoreszenzbasierte optische Bildgebungsmodalitäten in der nicht-invasiven tierexperimentellen Forschung zunehmend an Bedeutung [34].

Die planare Bildgebung von Fluoreszenzverteilungen ist eine einfache, günstige und schnelle Methode, um *in vivo* molekulare Informationen innerhalb des Körpers von Kleintieren zu visualisieren. Der Informationsgehalt über die tatsächliche Größe und Intensität der Signale (bzw. der Fluoreszenzkonzentration) ist jedoch stark limitiert, da die hohe Streuung von biologischem Gewebe zu unscharfen Bild-daten führt und eine genaue Kantendetektion verhindert [23]. In klinischen Studien der Chirurgie wird die planare Bildgebung erfolgreich zur Identifikation und gezielten Entnahme (Biopsie) des Wächterlymphknotens bei Krebspatienten verwendet. Durch die Wächterlymphknoten-Biopsie soll verhindert werden, dass beispielsweise Brustkrebspatientinnen zu viele Achsellymphknoten entfernt werden und es in Folge dessen zu Lymphstauungen im Arm kommt [9, 16].

Die Molekulare Fluoreszenztomographie (FMT) beantwortete bereits zahlreiche medizinische Fragestellungen innerhalb von Kleintieren mit einer räumlichen Auflösung von Submillimetern [1, 10, 17, 20, 21, 24, 30]. FMT ist auf Messungen von Proben im nah- und infraroten Wellenlängenbereich limitiert, da diese Systeme im Durchlichtmodus arbeiten (siehe Kapitel 1.3). Jedoch liegen die Anregungs- und Emissionswellenlängen vieler gängiger fluoreszierender Proben in der Medizin und Biologie, insbesondere Fluoreszenzproteine (FP), im sichtbaren Wellenlängenbereich und bieten entsprechend nur eine stark limitierte Eindringtiefe in biologisches Gewebe [35].

Laminare Optische Tomographie (LOT) erwirbt in der tierexperimentellen Forschung zunehmend Aufmerksamkeit. Durch eine oberflächlich platzierte Punktlichtquelle und punktuelle Detektion kann die Hämoglobinkonzentration in den subkutanen Bereichen des Gewebes mit einer sehr hohen Auflösung *in vivo* bestimmt werden [14, 15]. Fluoreszenz-Laminare Optische Tomographie (FLOT) ist eine Weiterentwicklung von LOT, wobei eine linienförmige Beleuchtung über das zu untersuchende Objekt gescannt wird. Yuan et al. zeigten, dass subkutane Fluoreszenzverteilungen mit Eindringtiefen von bis zu 2-3 mm in Phantom- und *in vivo* Messungen lokalisiert werden können [37, 38].

Ziel dieser Dissertation ist die Erforschung und Entwicklung einer neuen, nicht-

invasiven Bildgebungstechnik, welche die Vorteile der oben genannten Modalitäten kombiniert: die Mesoskopische Epifluoreszenz Tomographie.

1.1 Systemaufbau

Im Folgenden wird eine schematische Darstellung des Systemaufbaus und dessen Funktionsweise geboten. Für nähere Details empfehlen sich die Veröffentlichungen von Björn et al. [5, 7].

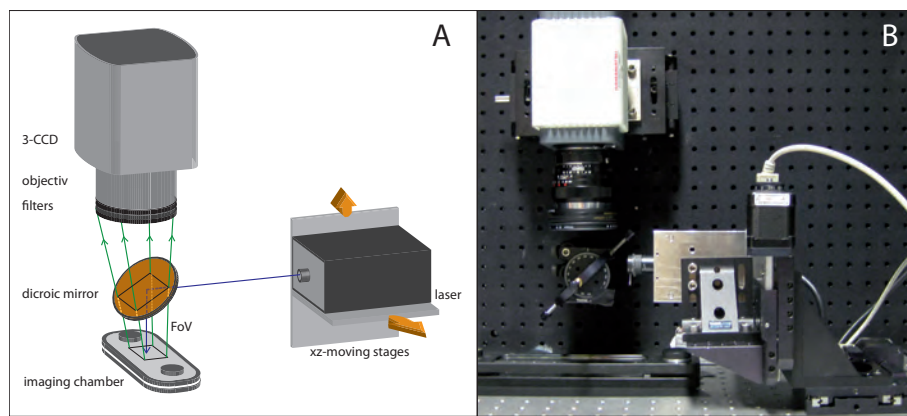


Abbildung 1.1: Mesoskopisches Epifluoreszenz Tomographie System. A) zeigt den systematischen Versuchsaufbau [5] und B) eine Fotografie.

Der Versuchsaufbau der Mesoskopischen Epifluoreszenz Tomographie (MEFT) gleicht einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, wobei die Lichtquelle durch einen kollimierten Laser ($\lambda_{exc} = 473\text{nm}$) ersetzt wurde. Der Laserstrahl wird durch einen dichroitischen Spiegel auf die Oberfläche des zu untersuchenden Gewebes reflektiert. Dichroitische Spiegel haben die Eigenschaft einen Teil des Lichtspektrums zu reflektieren und den Rest zu transmittieren. Mittels einer xy-Verfahreinheit, auf welcher der Laser befestigt ist, wird ein zwei-dimensionales Gitter aus Quellpositionen auf der Objektfläche abgerastert [5]. Licht, welches von Fluorochromen im Gewebe emittiert wird, hat aufgrund von Bewegungs- und Wärmeverlusten eine geringere Energie und entsprechend eine größere Wellenlänge als das Anregungslicht (im Fall des grünen Fluoreszenzproteins $\lambda_{exc} = 470\text{nm}$ und $\lambda_{em} = 509\text{nm}$). Die emittierte Epifluoreszenz

transmittiert infolge der größeren Wellenlänge durch den dichroitischen Spiegel und wird von einer 3-Kanal CCD* Kamera detektiert. Für jede Quellposition wird ein Kamerabild gespeichert. Diese Bilder dienen als Eingabedaten für die Rekonstruktion.

In Abbildung 1.1A ist der systematische Aufbau mit einer Komponentenbeschreibung dargestellt. Eine Fotografie des MEFT Systems, das im Labor des Institutes für Biologische und Medizinische Bildgebung aufgebaut wurde, ist in Abbildung 1.1B zu sehen.

1.2 Eingabedaten für die Rekonstruktion

Zur Veranschaulichung der Eingabedateien für den Rekonstruktionsalgorithmus sind entsprechende Kamerabilder der Phantomstudie aus Björn et al. [5] in Abbildung 1.2 dargestellt.

Untersucht wurde ein Phantom, das die optischen Eigenschaften von biologischem Gewebe nachbildet. In dieses wurde eine Kapillarröhre, gefüllt mit Fluorochromen (3,3'-Diocetadecyloxa-Carbocyanin Perchlorat (DiO)), eingebettet und durch einen Laser an 100 unterschiedlichen Positionen auf einem 9 mm x 9 mm großem Gitter angeregt. Bild (a) zeigt die Aufnahme während der 1. Laserposition, Bild (b) während der 50. und Bild (c) während der 100. Laserposition. In (a) ist zu erkennen, dass der Laser (roter Pfeil) zu einer Anregung der Fluorochrome in der Kapillarröhre (rote, gestrichelte Linien) führt. Ist der Laser auf der Kapillarröhre positioniert (b), so ist das detektierte Fluoreszenzsignal um bis zu einem Faktor 20 stärker. Entfernt sich der Laser erneut von der Kapillarröhre (c), so nimmt das Fluoreszenzsignal wieder ab. Summiert man alle Kamerabilder, die während der Messung an den 100 Quellpositionen detektiert wurden, erhält man Abbildung 1.2(d). Die Kapillarröhre ist horizontal in der Mitte des Bildes zu erkennen, wobei der Einfluss der hohen Streuung im untersuchten Phantom zu unscharfen Grenzen der Kapillarröhre führt.

*engl. charge-coupled device

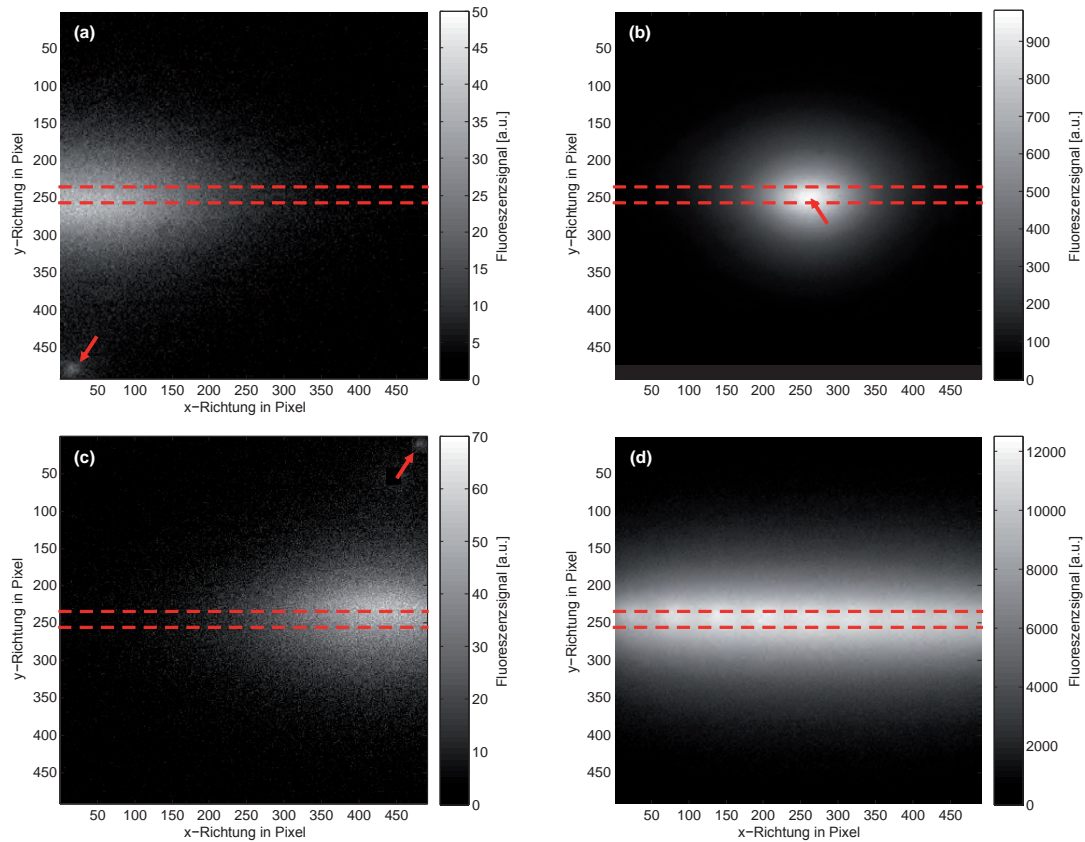


Abbildung 1.2: Exemplarische MEFT-Eingabedaten für die Rekonstruktion einer Phantomstudie. Gezeigt werden die Aufnahmen während der 1. (a), 50. (b) und 100. (c) Laserposition. Die roten Pfeile markieren die jeweilige Laserposition und die roten, gestrichelten Linien deuten die Seitenwände der Kapillarröhre an. Die Summe aller Aufnahmen wird in (d) gezeigt. Man erkennt deutlich die Position der Kapillarröhre, jedoch ist eine Detektion der tatsächlichen Außenflächen vor der Rekonstruktion der Daten nicht möglich.

1.3 Methodik der Rekonstruktion

Im Folgenden wird eine schematische Darstellung der Rekonstruktion und deren Methodik geboten. Für nähere Details empfehlen sich die Veröffentlichungen von Björn et al. [5, 7].

Aufgrund von hoher Absorption und Streuung im biologischen Gewebe ist die Rekonstruktion von optischen Tomographiesystemen verglichen mit anderen Modalitäten,

wie beispielsweise der CT, deutlich komplexer.

Als Absorption bezeichnet man eine physikalische Wechselwirkung, bei der das Licht seine Energie an die Umgebung abgibt und entsprechend nicht mehr detektiert werden kann. Die Absorption ist wellenlängenspezifisch und resultiert aus Absorbern, wie Hämoglobin, Lipiden und Wasser im Gewebe. Das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) unterliegt einer deutlich höheren Absorption, als Cyanine, die im nah- und infraroten Bereich emittieren und aufgrund der geringeren Absorption in diesem Wellenlängenbereich häufig in der Durchlichttomographie ihre Anwendung finden [35]. Aus Interaktionen zwischen Photonen und zellulären Strukturen resultieren Streueffekte, bei denen die Photonen ihre Richtung im Gewebe ändern können. So kommt es zu einer diffusen Ausbreitung des Lichts im Gewebe, wie von Ntziachristos gezeigt [25].

Um die Ausbreitung von Photonen im absorbierenden und streuenden Gewebe zu modellieren, wird in der Fluoreszenztomographie typischerweise die Diffusionsapproximation verwendet. Aufgrund der hohen Auflösung, die bei MEFT durch die Betrachtung kleiner Quell-Detektor-Abstände (bis zu $< 50 \mu\text{m}$) erreicht wird, kann auf diese Näherung während der MEFT Rekonstruktion nicht zurückgegriffen werden. Unter einem Quell-Detektor-Abstand versteht man den Abstand auf der Oberfläche des Messobjekts zwischen der Position der Laseranregung und der Position der detektierten Reflektion. Die Diffusionsapproximation bietet erst nach multiplen Streueffekten und entsprechend großen Quell-Detektor-Abständen ($> 1000 \mu\text{m}$) die nötige Genauigkeit [11, 19]. Für die Rekonstruktion der MEFT Daten wird auf Monte Carlo Simulationen zurückgegriffen, die auf der präziseren Strahlungstransport-Gleichung basieren [5].

Trifft ein Laserstrahl (roter Pfeil) senkrecht auf biologisches Gewebe, so sieht die Photonenverteilung typischerweise aus, wie in Abbildung 1.3 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich in unmittelbarer Nähe zur Laserquelle die meisten Photonen aufhalten und der Laserstrahl diffuser wird, je tiefer er in das Gewebe eindringt. Man spricht bei der dargestellten Photonenverteilung auch von der sogenannten Sensitivitätsfunktion. Sie gibt an, wie „sensitiv“ ein spezifischer Ort im Volumen für eine spezifische Quellposition ist. Ist ein Fluorochrom in oberflächigen Regionen und nahe der Quelle positioniert, wird es von vielen Photonen erreicht und entsprechend reagiert das System „sensitiver“ auf dieses Fluorochrom, als auf eines, das tief verborgen

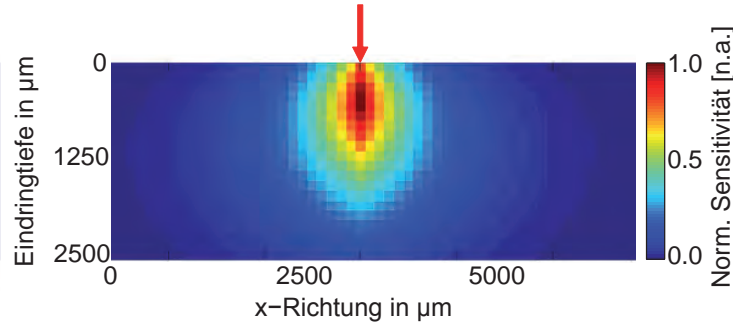


Abbildung 1.3: Exemplarische Photonenverteilung in biologischem Gewebe für eine gaußförmige Quelle (roter Pfeil).

liegt.

Für die Rekonstruktion wird das zu untersuchende Volumen in kleine drei-dimensionale Volumeneinheiten (Voxel) unterteilt. Die sogenannte Sensitivitätsmatrix (A -Matrix) beschreibt die Sensitivität aller Voxel für alle verwendeten Quell-Detektor-Paare einer Messung.

In Abbildung 1.4 werden Sensitivitätsfunktionen aus der A -Matrix für zwei unterschiedliche Quell-Detektor-Paare (Quelle/Detektor: Pfeil nach oben/unten) dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Sensitivität in oberflächigen Regionen bei einem geringeren Quell-Detektor-Abstand (a) besonders hoch ist, wobei die Sensitivität für tiefer liegende Voxel mit dem Quell-Detektor-Abstand steigt (b). Wäre ein Fluorochrom bei einer Tiefe von $1750 \mu\text{m}$ und in x -Richtung bei $2500 \mu\text{m}$ positioniert, so würde das Quell-Detektor-Paar aus (a) kein, oder ein schwaches Signal des Fluorochroms erhalten, jedoch würde das Quell-Detektor-Paar aus (b) ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal detektieren.

Mathematisch wird dieser Zusammenhang durch ein lineares Gleichungssystem $y = Ax$ beschrieben, wobei $y = \{y_{ij}\}$ einem Vektor aus den Eingabedaten für jedes Quell-Detektor-Paar ij entspricht. $x = \{x_v\}$ repräsentiert das zu rekonstruierende drei-dimensionale Volumen der Fluoreszenzverteilung für jedes Voxel v . Die Sensitivitäts-Matrix $A = \{A_{ij,v}\}$ wird durch Greensche Funktionen G^s für die Quelle und G^d für den Detektor beschrieben, als $A_{ij,v} = G_{ij,v}^s \cdot G_{ij,v}^d$.

Um die Fluoreszenzverteilung zu rekonstruieren, muss das Gleichungssystem gelöst werden. Aufgrund der Größe und Struktur der Matrix A ist die Lösung nicht tri-

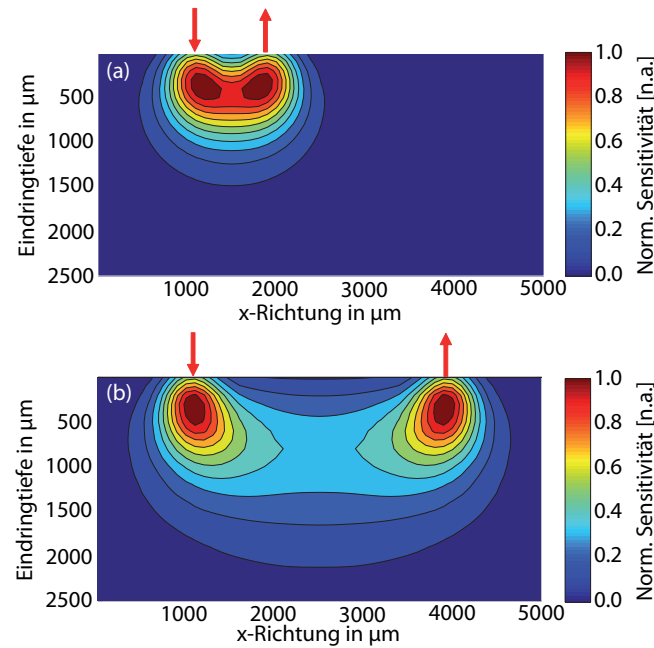


Abbildung 1.4: Exemplarische Photonenverteilung in biologischem Gewebe für eine spezifische Quelle (roter Pfeil nach unten) und je einen spezifischen Detektor (roter Pfeil nach oben).

vial und wird in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des iterativen LSQR-Algorithmus realisiert [26]. Für Details siehe [5].

1.4 Ergebnisse der Rekonstruktion

Als Ergebnis der Rekonstruktion erhält man ein drei-dimensionales Volumen bestehend aus Voxeln, welches die gesuchte Fluoreszenzverteilung des untersuchten Objekts beinhaltet. Zur Visualisierung können Schnittbilder, siehe Abbildung 1.5(a), oder auch extrahierte, drei-dimensionale Volumina (b) verwendet werden.

In den folgenden Veröffentlichungen werden technische Details des Systemaufbaus und des Rekonstruktionsalgorithmus erklärt. Die Promovendin ist bei beiden Fachartikeln Hauptautorin, da sie MEFT maßgeblich selbstständig entwickelte. Ihr oblag eigenverantwortlich die Komponentenauswahl, sowie der Aufbau des Laborsystems, die Ansteuerung der Systemkomponenten, die Entwicklung und Programmierung

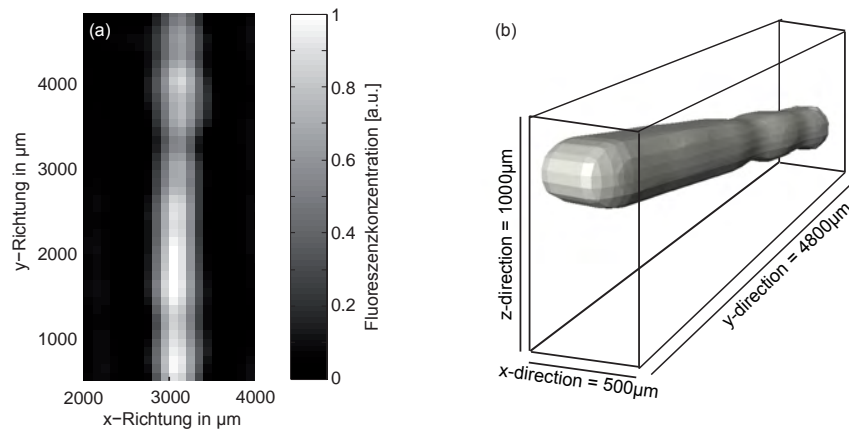


Abbildung 1.5: Rekonstruierte Fluoreszenzverteilung als Schnittbild (a), und als extrahiertes, drei-dimensionales Volumen (b) aus Björn et al. [7].

der Rekonstruktionsalgorithmen und die Konzipierung von Versuchsreihen. In der ersten Veröffentlichung werden Ergebnisse aus Simulations- und Phantomstudien präsentiert, wobei sich die zweite Veröffentlichung mit der Weiterentwicklung des Systems, sowie Phantom- und *ex vivo* Studien beschäftigt. Es wird gezeigt, dass die neuartige Mesoskopische Epifluoreszenz Tomographie die Detektion von subkutanen fluoreszierenden Farbstoffen im sichtbaren Wellenlängenbereich in biologischem Gewebe mit einer hohen räumlichen Auflösung ermöglicht.

2 Publiizierte Fachartikel

2.1 Erste Veröffentlichung

**Mesoscopic Epifluorescence Tomography:
Reconstruction of superficial and deep fluorescence
in highly-scattering media**

publiziert von

Saskia Björn, Vasilis Ntziachristos und Ralf Schulz

veröffentlicht in

Optics Express, Vol. 18, Issue 8, 2010

und

Virtual Journal for Biomedical Optics, Vol. 5, Issue 8, 2010

Original Manuskript eingereicht am	9. Dezember 2009
Überarbeitetes Manuskript eingereicht am	26. Februar 2010
Manuskript akzeptiert am	10. März 2010
Veröffentlicht am	7. April 2010

Mesoscopic Epifluorescence Tomography: Reconstruction of superficial and deep fluorescence in highly-scattering media

Saskia Björn*, Vasilis Ntziachristos, and Ralf Schulz

*Institute for Biological and Medical Imaging (IBMI), Helmholtz Zentrum München,
D-85764 Neuherberg, Germany*

**saskia.bjoern@helmholtz-muenchen.de*

Abstract: Mesoscopic Epifluorescence Tomography (MEFT) is a technique derived from Laminar Optical Tomography (LOT), determining fluorescence biodistribution by tomographic means in reflectance geometry. A pencil beam is scanned over the region of interest to excite fluorophores hidden within the tissue, while a CCD camera acquires images of reflected fluorescence emissions. This configuration is advantageous whenever transillumination of the specimen is not feasible, e.g., in the presence of skin chambers or when using wavelengths in the visible range where absorption is high. We present simulation and phantom studies recovering deep GFP-like fluorescence in highly scattering and strongly absorbing media with a penetration depth up to 10mm.

©2010 Optical Society of America

OCIS codes: (100.6950) Tomographic image processing; (260.2510) Fluorescence; (290.7050) Turbid media.

References and links

1. V. Ntziachristos, J. Ripoll, L. V. Wang, and R. Weissleder, "Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging," *Nat Biotechnol* **23**, 313-320 (2005).
2. D. Hyde, R. de Kleine, S. A. MacLaurin, E. Miller, D. H. Brooks, T. Krucker, and V. Ntziachristos, "Hybrid FMT-CT imaging of amyloid-beta plaques in a murine Alzheimer's disease model," *Neuroimage* **44**, 1304-11 (2009).
3. N. Deliolanis, T. Lasser, D. Hyde, A. Soubret, J. Ripoll, and V. Ntziachristos, "Free-space fluorescence molecular tomography utilizing 360 degrees geometry projections," *Opt. Lett.* **32**, 382-384 (2007).
4. A. Da Silva, M. Leabad, C. Driol, T. Bordy, M. Debourdeau, J. M. Dinten, P. Peltié, and P. Rizo, "Optical calibration protocol for an x-ray and optical multimodality tomography system dedicated to small-animal examination," *Appl. Opt.* **48**, D151-D162 (2009).
5. D. Kepshire, N. Mincu, M. Hutchins, J. Gruber, H. Dehghani, J. Hypnarowski, F. Leblond, M. Khayat, and B. W. Pogue, "A microcomputed tomography guided fluorescence tomography system for small animal molecular imaging," *Rev. Sci. Instrum.* **80**, 043701 (2009).
6. A. Koenig, L. Hervé, V. Jossierand, M. Berger, J. Boutet, A. Da Silva, J. M. Dinten, P. Peltié, J. L. Coll, P. Rizo, "In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography," *J. Biomed. Opt.* **13**, 011008 (2008).
7. J. Sharpe, U. Ahlgren, P. Perry, B. Hill, A. Ross, J. Hecksher-Sørensen, R. Baldock, D. Davidson, "Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies," *Science* **296**, 541-545 (2002).
8. C. Vinegoni, C. Pitsouli, D. Razansky, N. Perrimon, V. Ntziachristos, "In vivo imaging of *Drosophila melanogaster* pupae with mesoscopic fluorescence tomography," *Nat. Meth.* **5**, 45-47 (2008).
9. E. M. C. Hillman, D. A. Boas, A. M. Dale, and A. K. Dunn, "Laminar optical tomography: demonstration of millimeter-scale depth-resolved imaging in turbid media," *Opt. Lett.* **29**, 1650-1652 (2004).
10. S. Yuan, L. Qian, J. Jiang, A. Cable, and Y. Chen, "Three-dimensional coregistered optical coherence tomography and line-scanning fluorescence laminar optical tomography," *Opt. Lett.* **34**, 1615-1617 (2009).
11. B. Yuan, S. A. Burgess, A. Iranmahboob, M. B. Bouchard, N. Lehrer, C. Bordier, and E. M. C. Hillman, "A system for high-resolution depth-resolved optical imaging of fluorescence and absorption contrast," *Rev. Sci. Instrum.* **80**, 043706-1 (2009).

12. R. Weissleder and V. Ntziachristos, "Shedding light onto live molecular targets," *Nat. Med.* **9**, 123-128 (2003).
 13. A. Garofalakis, G. Zacharakis, H. Meyer, E. N. Economou, C. Mamalaki, J. Papamatheakis, D. Kioussis, V. Ntziachristos, and J. Ripoll, "Three-dimensional in vivo imaging of green fluorescent protein-expressing T cells in mice with noncontact fluorescence molecular tomography," *Mol. Imaging* **6**, 96-107 (2007).
 14. R. M. Hoffman, "Recent advances on in vivo Imaging with fluorescent proteins," *Fluorescent Proteins*, Second Edition **85**, 485-495 (2008).
 15. A. Dunn and D. Boas, "Transport-based image reconstruction in turbid media with small source-detector separations," *Opt. Lett.* **25**, 1777-1779 (2000).
 16. S. L. Jacques and B.W. Pogue, "Tutorial on diffuse light transport," *J. Biomed. Opt.* **13**, 041302 (2008).
 17. L-H. Wang, S.L. Jacques and L-Q. Zheng, "Mcm1 - Monte-Carlo Modeling of Light Transport in Multilayered Tissues," *Comput. Methods Programs in Biomed.* **47**, 131-146 (1995).
 18. C. C. Paige, and M. A. Saunders, "LSQR: An algorithm for sparse linear equations and sparse least squares," *ACM Trans. Math. Softw.* **8** 43-71 (1982).
-

1. Introduction

Fluorescence Tomography is an emerging technique to reconstruct and quantify biofluorescence distributions in tissues or animals, visualizing tissue function at the physiological, metabolic and molecular level with high quantitative accuracy inside living specimen [1]. Tomographic reconstruction typically relies on the inversion of a suitable model for photon propagation. Larger specimens such as mice require a diffusion based model, restricting resolution to the order of 1mm. Here, mostly the near-infrared region of light is used to image probe accumulation in diseases such as Alzheimer's [2] and cancer [3-6].

In smaller specimen, resolution can be greatly improved to an order of 10-50 μ m using microscopic imaging methods together with alternative mathematical models for light propagation. Two examples are Radon-based methods such as optical projection tomography [7] for transparent specimen or Fokker-Planck [8] for slightly diffusive objects such as drosophila pupae.

All of these methods, however, require transillumination of the specimen and can thus not be applied to larger animals or when skin flaps or skin chambers have to be used. This gap is bridged by methods derived from Laminar Optical Tomography (LOT) which allow for three-dimensional recovery of absorption with approximately 200 μ m resolution in depths up to a few millimeters [9].

Yuan et al. recently developed a line-scan epifluorescence tomography system and showed the potential to image superficial fluorescence with high sensitivity and penetration depths of up to 2-3mm [10, 11]. Similar to this approach we propose a setup for mesoscopic epifluorescence tomography (MEFT) for applications in fluorescent protein imaging in the visible. The system is based on point source illumination instead, and is capable of reconstructing 3D-structures up to 10mm in depth. This depth sensitivity can be achieved even though the fluorescent dyes utilized emit in the visible range where trans-illumination is not practical due to high absorption (in the case of Green Fluorescent Protein (GFP) imaging) or presence of artificial structures such as skin chambers in vivo [12].

Although a few studies for real GFP tomography with fluorescence molecular tomography (FMT) have showcased the principal feasibility [13], the intrinsic brightness of FP expression in vivo [14] allows even for deep-tissue reflectance imaging which has become a standard tool and is much easier to apply. From the development of reflectance-like tomographic approaches such as MEFT we expect an improvement of imaging results without requiring many changes in the experimental protocol.

2. Theory

To model photon propagation in thick turbid media for fluorescence tomography, the diffusion approximation is commonly used. As a diffusion model is only valid far away from

the source [15, 16], Monte Carlo simulations based on the more accurate radiative transfer equation are used for calculating according sensitivity functions. The Monte Carlo code is based on MCML [17].

In reflectance geometry, unlike transmission geometry, the distance between source and detector points is related to the mean probing depth of the sensitivity functions. In other words, the further away fluorescence emissions are detected from the point of illumination, the deeper on average this signal originated in the tissue (see Fig. 1). In this way, we receive different information for each spot that is scanned and each depends on a differently weighted depth-sensitivity. The detected measurements are then reconstructed with an algorithm that incorporates a corresponding sensitivity matrix \mathbf{A} .

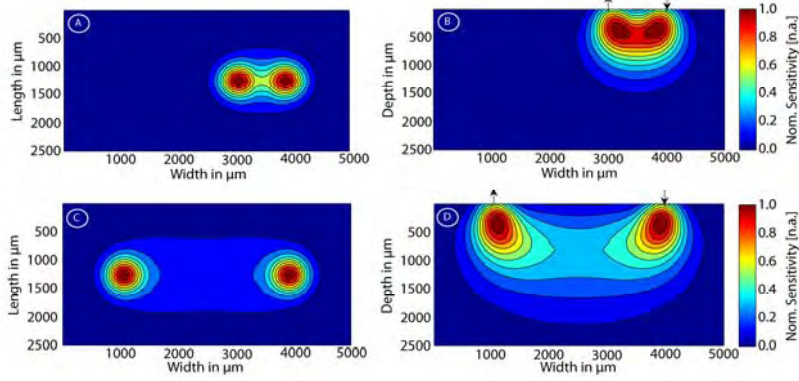


Fig. 1. Exemplary source-detector sensitivity functions as calculated by Monte Carlo simulations (normalized to one, $\mu_a=0.1\text{mm}^{-1}$, $\mu_s=20\text{mm}^{-1}$, $g=0.9$). A and C indicate the top and B and D the side views of the three dimensional simulated sensitivity functions. As the effective distance between the source (arrow down) and detector (arrow up) increases, the sensitivity profile of the measurements gradually reaches deeper into the medium.

The \mathbf{A} -matrix is given by a mathematical model of light propagation in scattering tissue and is composed of Green's functions that predict for each voxel the influence of fluorescence on a given source-detector measurement. To model the collimated laser beam used as a source in the experiments, the simulated sensitivity function was convolved with a Gaussian kernel, yielding an accurate description of the source term G^s . For the Green's function of the detector term G^d the sensitivity function was convolved with a window function to model the influence of the rectangular pixel shape on the CCD detector. The specific source-detector sensitivity is then given by the product of G^s and G^d . Fig. 1 depicts the accordingly computed Green's functions, showing increasing penetration depth of the sensitivity function for increasing source-detector separations.

The reconstruction problem is given by $y=Ax$, where $y=\{y_{ij}\}$ is the vector of raw MEFT measurements for each source-detector pair ij , and $x=\{x_v\}$ is the 3D volume of fluorescence distribution given for each voxel v . The sensitivity or weight matrix $A=\{A_{ij,v}\}$ is given by source and detector Green's functions as $A_{ij,v} = G_{ij,v}^s \cdot G_{ij,v}^d$.

The necessary inversion of \mathbf{A} was performed by the iterative LSQR algorithm that has a good numerical stability when \mathbf{A} is ill-conditioned [18]. The number of iterations was chosen depending on the residual, as described below.

3. Methods and materials

The MEFT system employs a point source to image fluorescence bio-distribution in the visible (Fig. 2). As a light source we utilized a diode laser-pumped all-solid-state laser with an output power of 5mW at a wavelength of $\lambda = 473\text{nm}$ (CNI, Changchun, China). The

collimated laser beam was reflected at a dichroic mirror (Thorlabs, Newton, NJ, USA) and scanned over the object's surface using x/z-moving stages (Standa, Vilnius, Lithuania) with a travel range of respectively 25mm in each direction to create arbitrary excitation points. The emitted light was transmitted back through the dichroic mirror and a long pass colour filter (455nm, Schneider Optik, Bad Kreuznach, Germany). To reduce the intensity of directly reflected light from the external excitation source a linear polarisation filter (ScreenLab, Elmshorn, Germany) was employed. Epi-fluorescence was collected by a 12-bit 3-CCD camera with a frame rate of 51.5Hz (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) in the detection pathway of the microscope. The CCD was equipped with an objective that had a focal distance of 35mm (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

The background levels were subtracted from the images obtained using different source positions in the region of interest and then utilized as input for the reconstruction algorithm described above.

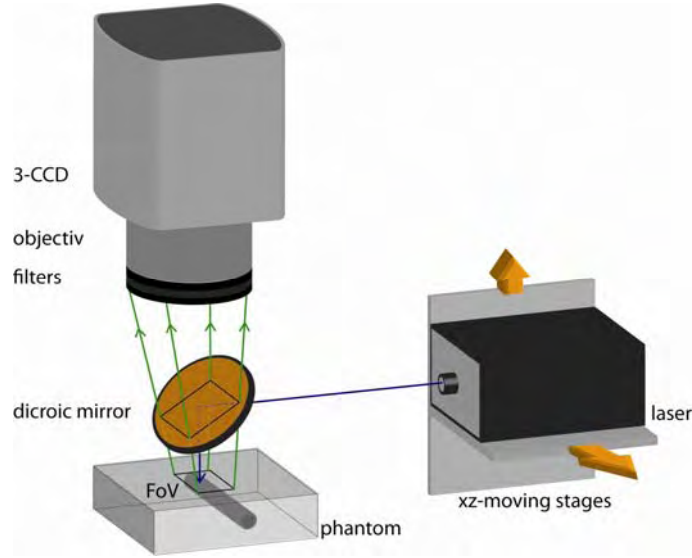


Fig. 2. Schematic setup of the Mesoscopic Epi-Fluorescence Tomography system.

Initial simulation studies were performed to obtain the achievable penetration depth and to approximate the in vivo case of spatially and intensity-wise variable emitter distribution. We simulated for predefined fluorescence test object x_{exact} measurement data y using $y = A \cdot x_{exact} + e_{noise}$. Here the noise term was set at 0.5% additive Gaussian random. Additionally we accounted the dynamic of a 12-bit CCD camera. Reconstructions were performed as described in section 2.

To quantify the theoretically achievable penetration depth, initial simulation studies were performed using six different cylindrical emitters ($\varnothing 1250\mu\text{m}$), containing different amounts of emitter concentration, placed at different depths within a scattering slab ($70 \times 35 \times 20 \text{ mm}^3$) of tissue-like properties ($\mu_a = 0.1 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_s = 10 \text{ mm}^{-1}$, anisotropy factor $g = 0.9$). A region of interest of the simulation setup is shown in Fig. 3A. A grid of 7×7 source positions at a spacing of 1mm and 700×350 detectors were utilized. Furthermore, we simulated a three-dimensional slab ($3 \times 3 \times 2 \text{ mm}^3$) of tissue-like properties ($\mu_a = 0.1 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_s = 10 \text{ mm}^{-1}$, anisotropy factor $g = 0.9$) to approximate the in vivo case of spatially and intensity-wise variable emitter distribution. In the tank, we placed two parallel tubes ($\varnothing 150\mu\text{m}$) in a distance of $750\mu\text{m}$ filled with an constantly increasing (Fig. 4Aa) and decreasing (b) fluorescence concentration ($c_{low} = 100 \text{ nM}$, $c_{high} = 1000 \text{ nM}$). A grid of 10×10 source positions at a spacing of 1mm and 60×61 detectors were utilized in the simulation.

Initial experimental studies were performed imaging a fluorescent tube (\varnothing 150 μ m) inserted in a tank (50x100x50mm³) filled with intralipid, india ink and water to mimic the strongly absorbing optical properties of tissue in the wavelength region of GFP emission ($\mu_a=0.1\text{mm}^{-1}$, $\mu_s=10\text{mm}^{-1}$, anisotropy factor $g=0.9$). The tube was mounted at different depths in the tank, ranging from 200 μ m to 10mm. Inside the tube, the scattering and absorbing background media was mixed with a fluorescent dye (3,3'-dioctadecyloxa-carbocyanine perchlorate [DiO], MobiTec, Göttingen, Germany) in a concentration of 200nM. DiO offers excitation and emission wavelengths ($\lambda_x=489\text{nm}$, $\lambda_m=501\text{nm}$) similar to GFP. Depending on the detected signals exposure times were set between 1ms for a tube depth of 200 μ m and 4000ms for a tube depth of 10mm. However the exposure time was held constant for all measurements at one tube depth.

A grid of 10x10 source positions separated by 1mm in each direction was used in the imaging experiments. The measured data volume thus consisted of 100 images at 1024 x 1344 pixel resolution. To reduce the data fed into the reconstruction process, images were reduced by a factor of ten using bicubic interpolation, and a region of interest was chosen inside the images. The resulting image pixels were utilized as detector positions in the reconstruction algorithm. The number of iterations ranged between 50 and 100 and were chosen such that the estimated residual $|x'_k - x'_{k+1}| < \tau$, whereas x' is the reconstructed fluorescence bio-distribution, k is the number of iteration and τ is an empirically determined threshold.

The contrast to noise ratio $C = |I_1 - I_2| \cdot \sigma^{-1}$ was calculated to evaluate the signal quality, whereas I_1 and I_2 are the 95th percentile and 5th percentile of the maximum intensity, respectively, and σ is the standard deviation of the dark image noise (see Fig. 6B).

To define system performance, the leakage of excitation light was measured for different exposure times. First, the fluorescent tube was removed and the plain tissue mimicking phantom was excited by the laser. The 95th percentile of the maximum intensity in the accordingly detected raw image was plotted for exposure times ranging from 1ms up to 4200ms (see Fig. 6A)

4. Results

The results of the simulation study that quantifies the achievable penetration depth are shown in Fig. 3. The region of interest of the fluorescent input x_{exact} (A) and reconstructed fluorescence distribution (B) are similar up to a depth of 10mm, while the reconstruction fails to resolve deeper objects. The deviation of the fluorescent input and the reconstructed distribution is illustrated in Fig. 3C.

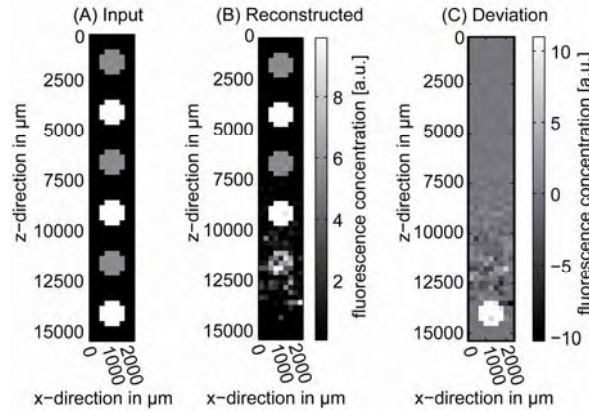


Fig. 3. Simulation of maximum penetration depth. (A) Slice in the region of interest of the simulated slab including six different fluorescent tube emitters at different depths. White emitters contain double the amount of simulated fluorophores. (B) Corresponding slice of the reconstructed fluorescence distribution and (C) deviation of fluorescent input and reconstruction.

The second simulation study demonstrates the potential of the applied LSQR algorithm to reconstruct spatially and intensity-wise variable emitter distributions (Fig. 4). Slices parallel to the surface at the depth of the tubes are shown for the fluorescent input (A) and reconstructed fluorescence distribution (C). Transversal slices through the middle of the tubes are illustrated for the fluorescent input (B) and reconstruction (D). Even though the reconstructed fluorescence distributions seem to be slightly blurred, both, the variable fluorescence concentration and the depth are well reconstructed.

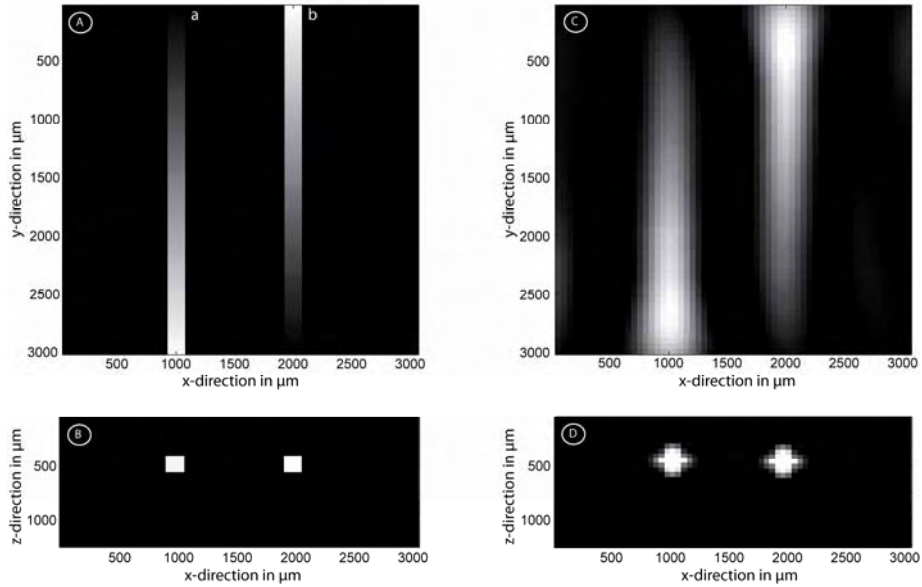


Fig. 4. Demonstration of the LSQR algorithm's potential to reconstruct spatially and intensity-wise variable emitter distributions. Slices parallel to the surface at the depth of the tube for the fluorescent input (A) and reconstructed fluorescence distribution (C). Transversal slices through the middle of the tubes for the fluorescent input (B) and reconstruction (D).

To get an impression of the overall fluorescence intensity distribution within the region of interest, all acquired images (one for each source position chosen) were added together on a per-pixel basis. For the case of the tube being placed at a depth of $200\mu\text{m}$ this is depicted in Fig. 5A. The according 3D reconstruction of that experiment is partially depicted in Figs. 5B and C, showing recovered axial and transversal slices of the 3D fluorescence distributions at the center of the tube. From these cuts, the full width half maximum (FWHM) of the reconstructed transversal tube shape can be determined in both spatial directions. As expected, there is a clear improvement in specifying the diameter of the tube between the raw (Fig. 5A) and reconstructed (Fig. 5B) data. The raw images appear quite blurred, whereas the reconstructed tube diameter agrees precisely with the actual diameter.

The experiment was repeated with different tube depths. For each experiment, the reconstructed FWHM as well as the recovered location in depth of the tube center was determined. The constant line in Fig. 5D depicts the actual tube diameter, whereas the others depict the size of the FWHM of the intensities in the raw and reconstructed data sets. Due to the highly scattering background the diameter of the tube increases the deeper the tube is hidden in the media. However the reconstructed tube diameter is much closer to the actual value.

The reconstructed tube depths are indicated in Fig. 5E together with the depth as set in the experiment. We found the results to be fairly accurate until a depth of $700\mu\text{m}$ after which reconstruction accuracy starts to deteriorate.

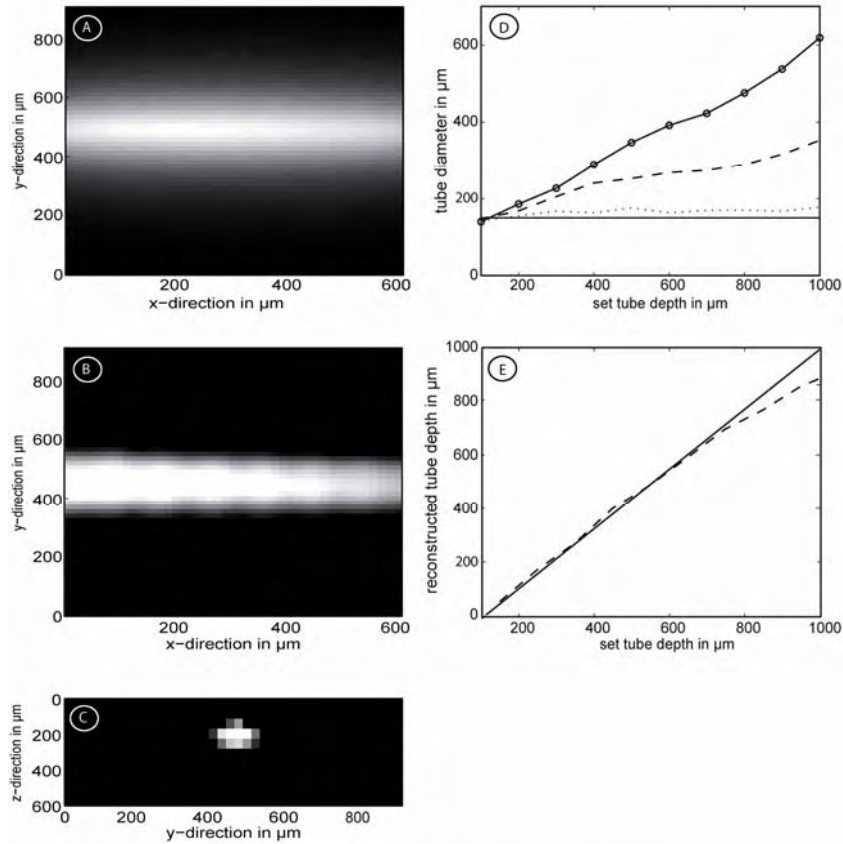


Fig. 5. MEFT phantom imaging results. (A) Summation of all acquired images where the tube centre was located at a depth of 200µm. (B, C) Tomographic slices through the volume of reconstructed fluorescence where the tube was located at a depth of 200µm. (B) A slice parallel to the surface at the depth of the tube. (C) Transversal slice through the reconstructed tube. (D) Plot of the reconstructed tube diameter (FWHM) for different depths of the tube. The constant line depicts the actual tube diameter. The constant line with dots indicates the tube diameter of the raw measurements. The dashed curve shows the reconstructed diameter in y-direction and the dotted in z-direction. (E) Reconstructed depth in comparison to actual depth where the constant line indicates the actual and the dashed curve the reconstructed depths.

The excitation light leakage (A) and the contrast to noise ratio (B) are shown in Fig. 6. We discovered the influence of the leakage to be negligible since it alternates in-between the background levels that are subtracted. As expected the contrast to noise ratio decreases, however also the lower ratio remains sufficiently high for the reconstruction.

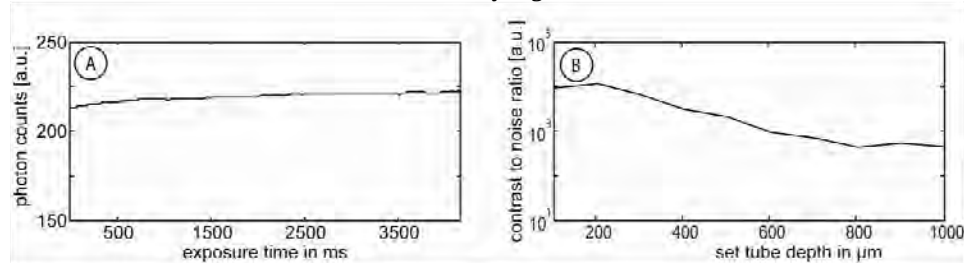


Fig. 6. Characterization of the system performance. (A) Measured leakage of the excitation light as a function of exposure time. (B) Calculated contrast to noise ratio for different tube depths.

5. Discussion

Herein we show the strong potential of our presented MEFT system to reconstruct fluorescence distributions in the visible with a high depth sensitivity and accuracy. In a simulation study taking into account typical noise levels and the limited dynamic range of the camera, a maximum penetration depth of 10mm was estimated. This will, of course, be further limited in practice, due to the presence of optical inhomogeneities, limited laser power, and thus non-optimal illumination of fluorescence images.

Due to the reflectance geometry employed in the setup it is difficult to normalize data using reflectance measurements at the laser wavelengths. As the dynamic range of the overall image is limited, an acquired image of the laser excitation spot would either saturate, or decay rapidly to a background value away from the source spot. This would leave a very small portion of these images to be useful for normalization, thus drastically reduce the maximum source-detector separation and the possible penetration depth. Therefore, to correct for optical inhomogeneities, other potentially novel methods for data preprocessing and preconditioning would be required.

Future work will focus on in vivo measurements, since the microscopic spatial heterogeneities and auto fluorescence cannot be mimicked in tissue phantoms. So far the colour information of the 3CCD camera was not employed and this information could presumably be used for the separation of GFP and auto fluorescence signals in biological specimen.

Acknowledgments

The research described in here was funded by the German Research Council (DFG) under grant number SCHU-2378, and by the German Academic Exchange Service (DAAD) under grant number D/0707645.

2.2 Zweite Veröffentlichung

**Reconstruction of
Fluorescence Distribution hidden
in Biological Tissue using
Mesoscopic Epifluorescence Tomography**

publiziert von

**Saskia Björn, Karl-Hans Englmeier,
Vasilis Ntziachristos und Ralf Schulz**

veröffentlicht in

Journal of Biomedical Optics, Vol. 16, 046005, 2011

Original Manuskript eingereicht am	14. Oktober 2010
Erste Überarbeitung eingereicht am	07. Januar 2011
Zweite Überarbeitung eingereicht am	08. Februar 2011
Manuskript akzeptiert am	10. Februar 2011
Veröffentlicht am	13. April 2011

Journal of Biomedical Optics

SPIEDigitalLibrary.org/jbo

Reconstruction of fluorescence distribution hidden in biological tissue using mesoscopic epifluorescence tomography

Saskia Björn
Karl-Hans Englmeier
Vasilis Ntziachristos
Ralf Schulz



Reconstruction of fluorescence distribution hidden in biological tissue using mesoscopic epifluorescence tomography

Saskia Björn, Karl-Hans Englmeier, Vasilis Ntziachristos, and Ralf Schulz

Institute for Biological and Medical Imaging (IBMI), Helmholtz Zentrum München, Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Neuherberg, Germany

Abstract. Mesoscopic epifluorescence tomography is a novel technique that discovers fluorescence bio-distribution in small animals by tomographic means in reflectance geometry. A collimated laser beam is scanned over the skin surface to excite fluorophores hidden within the tissue while a CCD camera acquires an image of the fluorescence emission for each source position. This configuration is highly efficient in the visible spectrum range where trans-illumination imaging of small animals is not feasible due to the high tissue absorption and scattering in biological organisms. The reconstruction algorithm is similar to the one used in fluorescence molecular tomography. However, diffusion theory cannot be employed since the source-detector separation for most image pixels is comparable to or below the scattering length of the tissue. Instead Monte Carlo simulations are utilized to predict the sensitivity functions. In a phantom study we show the effect of using enhanced source grid arrangements during the data acquisition and the reconstruction process to minimize boundary artefacts. Furthermore, we present *ex vivo* data that show high spatial resolution and quantitative accuracy in heterogeneous tissues using GFP-like fluorescence in B6-albino mice up to a depth of 1100 μm . © 2011 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE). [DOI: 10.1117/1.3560631]

Keywords: optical devices; fluorescence; scattering; absorption; reflection; tomography.

Paper 10566RR received Oct. 19, 2010; revised manuscript received Feb. 8, 2011; accepted for publication Feb. 10, 2011; published online Apr. 4, 2011.

1 Introduction

Recently we presented an approach to mesoscopic epifluorescence tomography (MEFT), imaging fluorophores emitting in the visible spectrum in reflectance geometry.¹ Simulation studies indicated a high potential to image green fluorescent protein (GFP)-like probes up to a penetration depth of 10 mm. Imaging studies performed on phantoms confirmed the capability to three-dimensionally reconstruct fluorescent objects surrounded by a tissue-like, highly scattering medium at different depths with high resolution. While these results were highly encouraging, the experiments and simulations could not mimic complex *in vivo* imaging situations with heterogeneous tissue structures.

Fluorescence tomography and all derived methods are emerging techniques to estimate fluorescence activity and image probe accumulation in diseases such as Alzheimer's² and cancer.³⁻⁶ Imaging systems that are based on transillumination geometries similar to x-ray tomography require probes emitting in the near-infrared due to the deep tissue penetration possible in that wavelength region. However, using transillumination makes it difficult to image larger animals or animals with opaque inclusions such as skin chambers. Existing fluorescence diffuse optical tomography systems that are employed in epifluorescence geometry and can serve this specific application, use a diffusion model for photon propagation.⁷ However, the diffusion approximation loses validity close to the surface and in

cases of small source-detector separation.⁸ Those restrictions are overcome by methods like MEFT and fluorescence laminar optical tomography (FLOT) that are derived from laminar optical tomography (LOT)^{9,10} and employ a reflectance geometry similar to fluorescence microscopy. FLOT utilizes a line scan illumination and has potential to image superficial fluorescence with high sensitivity and penetration depths up to 2 to 3 mm in phantoms and *in vivo*.¹¹⁻¹³

Frequently, it has been shown that reconstructions performed on uniform grids, chosen inside a region of interest (RoI), leads to artefacts nearby the boundaries. This is caused by the fact that diffuse light probes a large tissue volume; if the probed tissue volume, however, is only partially within the grid for which fluorescence values are reconstructed, measured fluorescence will be fully attributed to the grid, but not to locations outside the grid, increasing fluorescence values close to the grid boundaries. Therefore many groups proposed adaptive grid refinement in the reconstruction process.¹⁴⁻¹⁶ Without using adaptive grid refinements, we have tested different source grid arrangements during the data acquisition and the reconstruction process to minimize boundary artefacts.

To further outline the imaging performance of the previously described MEFT-system, we present herein *ex vivo* imaging studies performed in real, heterogeneous tissue, accurately resolving the presence of a GFP-like fluorescent object at different tissue depths up to 1100 μm , highlighting accurate spatial localization, as well as semiquantitative estimation of fluorescence concentration.

Address all correspondence to Saskia Björn, Helmholtz Zentrum München, Institute for Biological and Medical Imaging, Ingolstädter Landstraße 1, Neuherberg, 85764 Germany. Tel: 49-(0)-89-3187-4452; Fax: 49-(0)-3187-3017; E-mail: saskia.bjoern@helmholtz-muenchen.de

2 Theory

The mesoscopic epifluorescence tomography (MEFT) system, operating in reflectance geometry, utilizes the well-known relation between source-detector distance and overall depth of probed tissue—the larger the distance between illumination spot and detector, the deeper the fluorescent signal can be attributed.¹⁰ Thus, we require different source-detector sensitivity functions for each source-detector pair, describing the contribution of a 3D volume element (voxel) to the current measurement. Required sensitivity functions are calculated using Monte Carlo simulations based on the radiative transfer equation, since the diffusion model is only valid further away from the source.^{17,18} Monte Carlo calculations are performed using an adaptation of MCML,¹⁹ assuming homogeneous tissue structure and a semi-infinite volume with one flat surface.

Mathematically, the reconstruction problem is given by $y = Ax$, where $y = \{y_{ij}\}$ is the vector of raw MEFT fluorescence measurements for each source-detector pair ij , and $x = \{x_v\}$ is the 3D volume of fluorescence distribution given for each voxel v . The sensitivity or weight matrix $A = \{A_{ij,v}\}$ is given by source and detector Green's functions as $A_{ij,v} = G_{i,v}^s \cdot G_{j,v}^d$, where G^s and G^d denote source and detector sensitivities, respectively (for details see Ref. 1).

In order to estimate the three-dimensional fluorescence distribution, the sensitivity matrix A is inverted using the iterative LSQR algorithm.²⁰ The number of iterations is chosen automatically such that the estimated residual $|x'_k - x'_{k+1}| < \tau$, with x' denoting the reconstructed fluorescence bio-distribution, k being the number of iteration and τ an empirically determined threshold.

3 Methods and Materials

3.1 Experimental Setup

The mesoscopic epifluorescence tomography (MEFT) system employs standard optoelectronic components (Fig. 1). The beam of a diode laser-pumped all-solid-state laser with an

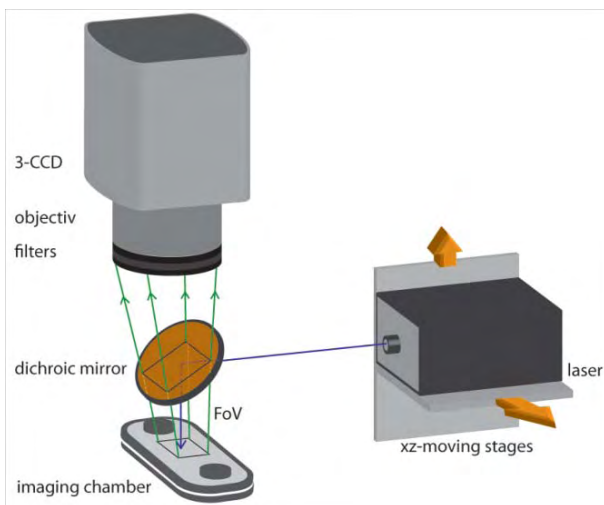


Fig. 1 Schematic setup of the mesoscopic epifluorescence tomography system.

output power of 5 mW at a wavelength of $\lambda = 473$ nm (CNI, Changchun, China) is reflected off a dichroic mirror (Thorlabs, Newton, New Jersey) and scanned over the object's surface using x/z -moving stages (Standa, Vilnius, Lithuania) with a travel range of 25 mm in each direction, to create arbitrary excitation points. Fluorescence emission reflected back into the optical pathway is transmitted through the dichroic mirror due to its longer wavelength, filtered through a long pass color filter (455 nm, Schneider Optik, Bad Kreuznach, Germany) and subsequently collected by a 12-bit 3-CCD camera with a frame rate of 51.5 Hz (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) using a 35 mm wide angle lens (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Acquired images are corrected for dark noise before feeding them into the reconstruction algorithm. To reduce required data storage and computation time, a region of interest in the images is chosen outside of which image data is discarded.

During the *ex vivo* experiments, the imaged specimen is fixed in an imaging chamber, which slightly compresses the animal using an adjustable glass plate, similar to chambers used in other *in vivo* tomographic imaging systems.²¹ The chamber guarantees that the animal remains stable and immobilized, without restraining breathing. In addition, using an imaging chamber allows transfer of the animal between imaging systems, e.g., to perform MEFT and x-ray tomography without body movement, making different measurements comparable to each other. Furthermore, the compression creates a defined flat imaging surface on the skin necessary for the currently used reconstruction algorithm.

3.2 Study Preparation

3.2.1 Phantom preparation

A flexible plastic tube ($\phi_{\text{inner}} = 150 \mu\text{m}$, $\phi_{\text{outer}} = 300 \mu\text{m}$, Labmarket GmbH, Mannheim, Germany) was inserted in a tank ($50 \times 100 \times 50 \text{ mm}^3$) filled with a solution of intralipid, india ink, and water to mimic the strongly absorbing optical properties of tissue in the wavelength region of GFP emission ($\mu_a = 0.1 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_s = 10 \text{ mm}^{-1}$, anisotropy factor $g = 0.9$). The tube was filled with DiO-dye (3,3'-dioctadecyloxa-carbocyanine perchlorate, MobiTec, Göttingen, Germany) at a concentration of 200 nM mixed with the scattering and absorbing background medium. DiO offers excitation and emission wavelengths ($\lambda_x = 489 \text{ nm}$, $\lambda_m = 501 \text{ nm}$) similar to GFP. Successively, the tube was raised in 500 μm steps in the tank to obtain different depths ranging from 200 to 2200 μm .

3.2.2 Animal preparation

Ex vivo studies were performed on two B6-albino mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) to investigate the potential of MEFT to reconstruct fluorescence distribution in biological tissue. Limitations of optical imaging include the light-absorbing properties of dark hair and skin pigment. The B6-albino mice used in this study maintain the genetic background of the commonly studied B6 mouse without the loss of signal due to dark hair and skin. Four flexible plastic tubes ($\phi_{\text{inner}} = 150 \mu\text{m}$) were filled with DiO-dye at a concentration of 200 nM, as previously described (Sec. 3.2.1). The B6-albino mice were euthanized and their fur was removed. The flexible tubes were fixed on surgical sutures (DS 30/3 metric, Resorba, Nürnberg, Germany)

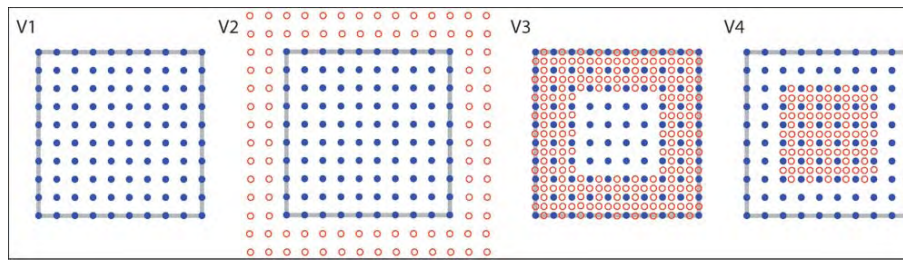


Fig. 2 Source grid arrangements applied in the phantom studies. The defined RoI is marked by a gray square and the blue dots indicate the commonly utilized sources (see V1). V2 shows the measurement series, where additional source positions (red circles) have been placed outside the RoI. V3 and V4 demonstrate the refinement of sources (red circles) that have been embedded in the outer and inner grid. (Color online only.)

and inserted into the muscles of the legs. For detailed *ex vivo* experimental results and analysis, one single, exemplary data set (mouse 1, right leg) is presented to estimate how well arbitrary objects at different depths can be reconstructed by the proposed method. Analogous values of the four different series of measurements are calculated and presented for comparison.

3.3 Experimental Setting

3.3.1 Phantom study

The region of interest was defined as a square with side lengths of $5000\ \mu\text{m}$ (see Fig. 2). A grid of 10×10 source positions with a spacing of $500\ \mu\text{m}$ [indicated by blue dots in Fig. 2(V1)] was placed on the RoI [indicated by the gray square in Fig. 2(V1)]. The measured data volume thus consisted of 100 images at the intrinsic CCD resolution of 1024×1344 pixels. For the second series of measurements, we added further sources outside of the RoI [see Fig. 2(V2)] and accordingly acquired 196 images. Figure 2(V3) indicates the third setting, where the outer grid was refined by positioning additional sources with a spacing of $250\ \mu\text{m}$ (red circles) and thus yielded a data volume of 296 images. Figure 2(V4) shows the complementary situation, where the inner source grid was refined. This led to a data set of 185 images. To reduce the amount of data fed into the reconstruction process, images were reduced by a factor of ten using bicubic interpolation, and a region of interest was chosen inside the images. The resulting image pixels were used as detector positions in the reconstruction algorithm. Numbers of iterations between 50 and 90 were automatically chosen as described above, refer to Sec. 2. Depending on the detected signals, exposure times were set between 4 ms for a tube depth of $200\ \mu\text{m}$ and 40 ms for a tube depth of $2200\ \mu\text{m}$. However, the exposure time was held constant for all measurements at one tube depth. To acquire purely planar epifluorescence images as control data, an expanded laser beam was used for image acquisition. Beam widening was achieved using a light diffuser (Luminit, Torrance, California) and led to a spot full width at half maximum of $24.7\ \text{mm}$.

3.3.2 Ex vivo study

The exposure time t for an *ex vivo* measurement at one source position was automatically determined to make optimal use of the CCD's dynamic range. Exposure times were set between 5 ms and 3500 ms, depending on the 95th percentile of signal intensities in the green channel of the 3-CCD camera, as

described by $P_{95}(I_{G,\text{control}} - I_{G,\text{background}})/t_{\text{control}} \cdot I_{G,\text{desired}} = t$. For each laser position, a first control image $I_{G,\text{control}}$ with an exposure time of $t_{\text{control}} = 10\ \text{ms}$, was acquired to estimate the maximum signal intensity. $I_{G,\text{background}}$ denotes the dark noise used to correct the green channel of the colour image, for which the 95th percentile P_{95} was calculated. The desired intensity $I_{G,\text{desired}}$ was defined as the maximum intensity of 3900 photon counts. This desired maximum was chosen well below the saturation limit of 4096 photon counts (based on the 12-bit CCD employed).

A grid of 11×11 source positions separated by $500\ \mu\text{m}$ in each direction was used in the imaging experiments. The measured data volume thus consisted of 121 images at 1024×1344 pixel resolution. As described in Sec. 3.3.1, we reduced the data fed into the reconstruction process and chose a RoI within the source grid arrangement similar to Fig. 2(V2), where the boundaries were excluded. Purely planar epifluorescence images were acquired as control data and the numbers of iterations (between 50 and 100) were automatically chosen as described in Sec. 2.

The contrast to noise ratio $C = |I_1 - I_2| \cdot \sigma^{-1}$ was calculated to evaluate signal quality, with I_1 and I_2 being the 95th percentile and 5th percentile of the maximum intensity, respectively, and σ denoting the standard deviation of the noise in the dark image.

Additionally, the leakage of excitation light was measured by exciting the shaved skin of the animal prior to inserting any fluorescent inclusion. The 95th percentile of the maximum intensity in the accordingly detected raw image was measured for exposure times ranging from 1 ms up to 3500 ms.

3.4 Validation of the Ex Vivo Results

To validate the reconstructed depth of the tube, we sectioned the imaged tissue and subsequently performed white light and fluorescence imaging using a modified cryoslicer system.²² For each measurement, the respective field of view (FOV) of the camera was marked on the skin of each mouse. Directly after the MEFT imaging session, the mice were frozen within the imaging chamber at -20°C to ensure that the geometry would not change between MEFT imaging and cryoslicing. Subsequently, the mice were removed from the chamber, and the tissue regions within the FOV of the measurements were embedded in optimal cutting temperature compound (OCT) and refrozen to -80°C . Afterwards, the tissue samples were cut in slices at a thickness of $250\ \mu\text{m}$, during which a white light image as well as a filtered fluorescence image was acquired for each slice. From the images, the depth and position of the fluorescent tube could be

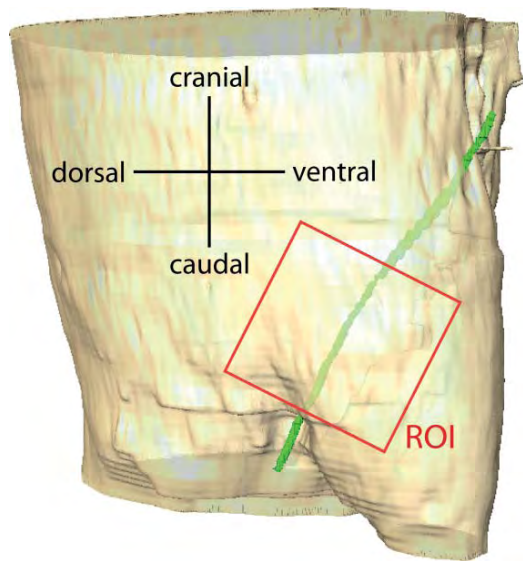


Fig. 3 Merged surfaceplots of the abdomen and inserted fluorescent tube (green) shown in the perspective of the camera (mouse 1, right leg). Additionally the region of interest and the anatomical orientations are indicated. (Color online only.)

accurately extracted as shown in Fig. 6(d). Furthermore, we used the cryosection images to create a surface plot of the abdomen of mouse 1 and the fluorescent tube that was inserted in its right leg. To get an impression of the perspective of the camera, the merged surface plots are shown in Fig. 3. Additionally the ROI and the anatomical orientations are indicated.

4 Results

4.1 Phantom Studies

The reconstruction results for the phantom study are shown in Fig. 4 for each tube depth (rows in the figure) and source grid arrangement (columns in the figure). In the first row, the epifluorescence images and their line profiles, which were detected orthogonal to the middle of the fluorescent tube, are shown. The full width at half maximum (FWHM) in the middle of the tube at a depth of $200\ \mu\text{m}$ was detected as $\text{FWHM}_{200\ \mu\text{m}} = 246\ \mu\text{m}$ and increased up to a $\text{FWHM}_{2200\ \mu\text{m}} = 780\ \mu\text{m}$ measured for a depth of $2200\ \mu\text{m}$. Slices of the reconstructed fluorescence distribution, following the center of the tube, are presented in the rows of the figure. Data acquisition and reconstruction performed with the source grid arrangement that is shown in Fig. 2(V1) lead to significantly improved reconstructions of shape and dimension of the tube (V1, $\text{FWHM}_{200\ \mu\text{m}} = 147\ \mu\text{m}$ and $\text{FWHM}_{2200\ \mu\text{m}} = 290\ \mu\text{m}$) as compared to the raw epifluorescence images. The results [Fig. 2(V2), $\text{FWHM}_{200\ \mu\text{m}} = 154\ \mu\text{m}$ and $\text{FWHM}_{2200\ \mu\text{m}} = 284\ \mu\text{m}$] of the enlarged source grid arrangement [Fig. 2(V2)] are comparable to the previous row Fig. 2(V1), but the boundary artifacts have been removed. However, in the case of imaging a limited area, e.g., the leg, some source-detector pairs of the enlarged source grid arrangement [Fig. 2(V2)] might be positioned outside of the tissue, which would lead to additional artefacts. One possible solution to overcome this limitation would be to refine the peripheral

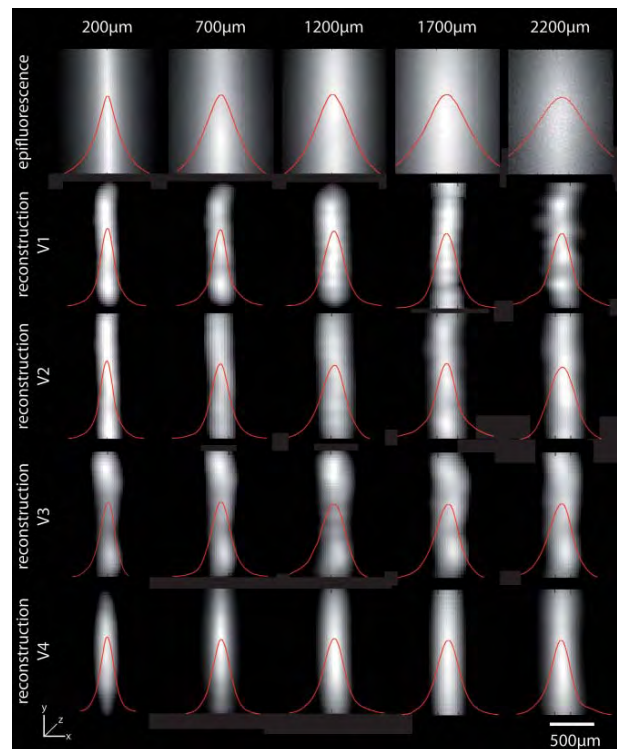


Fig. 4 The results of the phantom study are exposed for each tube depth (rows) and source grid arrangement (columns) in this table. In the first row the epifluorescence images and their line profiles, which were detected orthogonal to the middle of the fluorescent tube, are shown. Slices of the reconstructed tube, following the center of the reconstructed fluorescence distribution, are presented in the rows V1-V4 utilizing the source grid arrangement V1-V4.

grid by placing additional sources within the region of interest instead of outside the ROI, as shown in [Fig. 2(V3)]. However, the accuracy of reconstructions in fact deteriorated as boundary values of the ROI were imprecisely reconstructed ($\text{FWHM}_{200\ \mu\text{m}} = 150\ \mu\text{m}$ and $\text{FWHM}_{2200\ \mu\text{m}} = 209\ \mu\text{m}$). This behaviour can be explained easily as for sources and detectors located on the periphery, measurements are always fully attributed to the region of interest, but not to effects from outside this area. Therefore, the increased amount of measurements that detect signals coming from outside the ROI led to an increase in boundary artifacts. That finding led to the fourth arrangement [Fig. 2(V4)], where the inner source grid has been refined. Due to the additional sources in the inner volume, this area received a stronger weight during the reconstruction process. When reconstructing the tube at a depth of $200\ \mu\text{m}$, this source grid refinement has a negative impact, since the boundary areas are imprecisely reconstructed. However, the deeper the tube is covered in the surrounding material, the higher is the benefit of the source grid arrangement V4 [see Fig. 2(V4)] on the accuracy of the reconstructed shape and fluorescence distribution ($\text{FWHM}_{200\ \mu\text{m}} = 149\ \mu\text{m}$ and $\text{FWHM}_{2200\ \mu\text{m}} = 267\ \mu\text{m}$).

Due to the improved source grid arrangements, the data acquisition and reconstruction process are more time consuming. Data acquisition took $t = 4$ to 5 sec per source position, which led to a total acquisition time for one complete data set of t_{V1}

= 9 min (V1) up to $t_{V3} = 24$ min (V3). The reconstruction time for the enlarged volume [Fig. 2(V2)] or additional measurements [Figs. 2(V3) and 2(V4)] was measured as $t_{V1} = 9$ min (V1), $t_{V2} = 31$ min [Fig. 2(V2)], $t_{V3} = 26$ min [Fig. 2(V3)] and $t_{V4} = 17$ min [Fig. 2(V4)] per iteration.

To validate the phantom study using different source grid arrangements, a more quantitative analysis is presented in Fig. 5. The fluorescence distributions at a depth of 1200 μm along the tube are shown in Fig. 5(a). The solid line indicates the fluorescence signal at the center of the tube in the epifluorescence measurement. Accordingly, the reconstructed fluorescence concentrations using the source grid arrangement V1 (dashed curve), V2 (dotted line), V3 (line with diamonds), and V4 (line with circles) are presented. It can be seen that the variation of the detected fluorescence distributions measured in the epifluorescence image is negligible. This is due to the constant tube depth and homogeneous optical properties of the surrounding material. The source grid arrangement V1 leads to a steep drop of reconstructed fluorescence intensity at the grid boundaries to less than 60% of the maximum intensity. Utilizing the source grid arrangement V2 provides the best result, as the reconstructed fluorescence distribution is continuously more than 94% of the maximum. V3 yields a drop at the center of the tube to less than 80% of the maximum fluorescence distribution. This effect is due to the refined and thus higher weighted boundaries. The fluorescence distribution given by the source grid arrangement V4, drops to 90% at the boundaries. This effect is due to the refined and accordingly higher weighted inner volume. However, the benefit of the source grid arrangement V4 increases for deeper tube locations, as shown in Fig. 4. In Fig. 5(b), the actual tube diameter (line with dot markers) and the reconstructed values are plotted. The FWHM of the observed epifluorescence signal versus the tube depth is presented as a solid line. To obtain values of the reconstructed diameter using the source grid arrangements V1 (dashed line), V2 (dotted line), V3 (line with diamonds), and V4 (line with circles), the FWHM of the reconstructed tube was determined in the x - and z -direction for each slice along the tube (y -direction). The voxel values were averaged to obtain the signal values for each source depth. The FWHM in the planar image is, on average, more than three times larger than the actual tube diameter. However, the FWHMs of the reconstructions correspond well with the actual values, where the source grid arrangement V1 leads to the largest error at a depth of 2200 μm . In Fig. 5(c), the actual depth of the tube (solid line with dot markers) is plotted versus the average depth of the reconstructed fluorescence distribution. The reconstructed tube depths using the source grid arrangement V1 (dashed line), V2 (dotted line), V3 (line with diamonds), and V4 (line with circles) lead to similar results, where the localization error rises with increasing depth. The maximum error of 9% is obtained at a depth of 2200 μm for the reconstruction using the source grid arrangement V1.

4.2 Ex Vivo Studies

The results of the *ex vivo* measurements of mouse 1 (right leg) are presented in Fig. 6. The epifluorescence measurement is shown in Fig. 6(a). The intensity of the fluorescent signal strongly decays along the y -direction, corresponding to the increasing

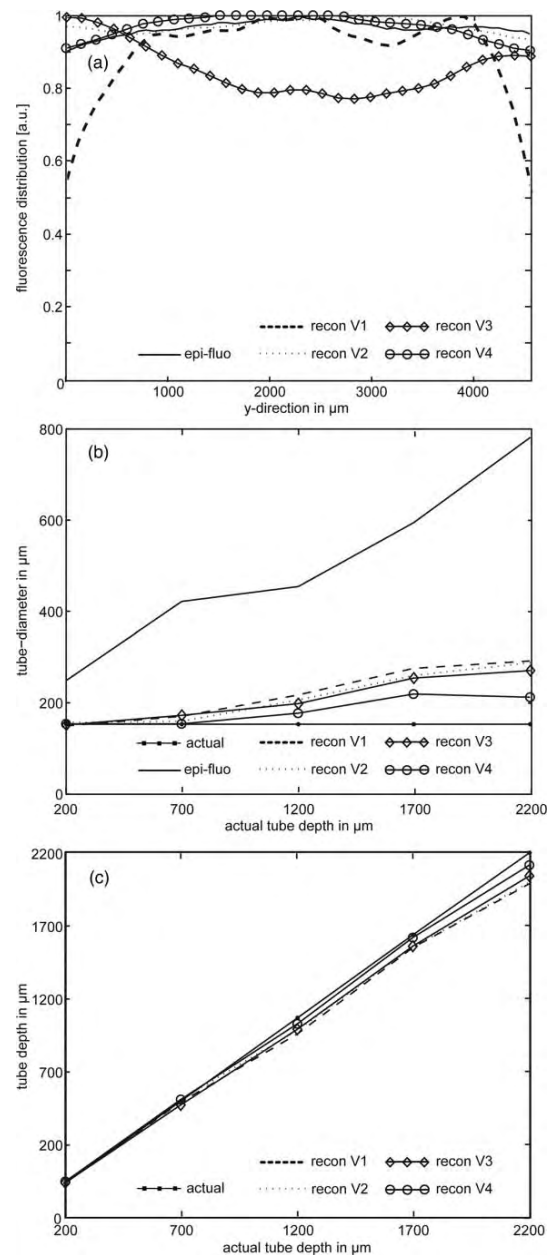


Fig. 5 Validation of MEFT phantom imaging results. (a) Fluorescence distribution in a depth of 1200 μm along the tube. The solid line depicts the relative fluorescence intensity in the epifluorescence imaging along the center of the tube. The reconstructed fluorescence concentration using the source grid arrangement V1 (dashed line), V2 (dotted line), V3 (line with diamonds), and V4 (line with circles) are presented. All curves were normalized to their respective maximum value. (b) Plot of the FWHM of the reconstructed tube diameter for different tube depths. The horizontal line with dot markers depicts the actual tube diameter of 150 μm . The solid line indicates the tube diameter in the epifluorescence image. To obtain the values of the reconstructed diameter using the source grid arrangement V1 (dashed line), V2 (dotted line), V3 (line with diamonds), and V4 (line with circles) the FWHM of the reconstructed tube was determined in the x - and z -direction for each slice along the tube (y -direction). The voxel values were averaged to obtain the signal values for each source depth. (c) Reconstructed depth in comparison to actual depth (solid line with dot markers). The dashed line indicates the source grid arrangement V1, the dotted line, V2, the line with diamonds, V3, and the line with circles, V4.

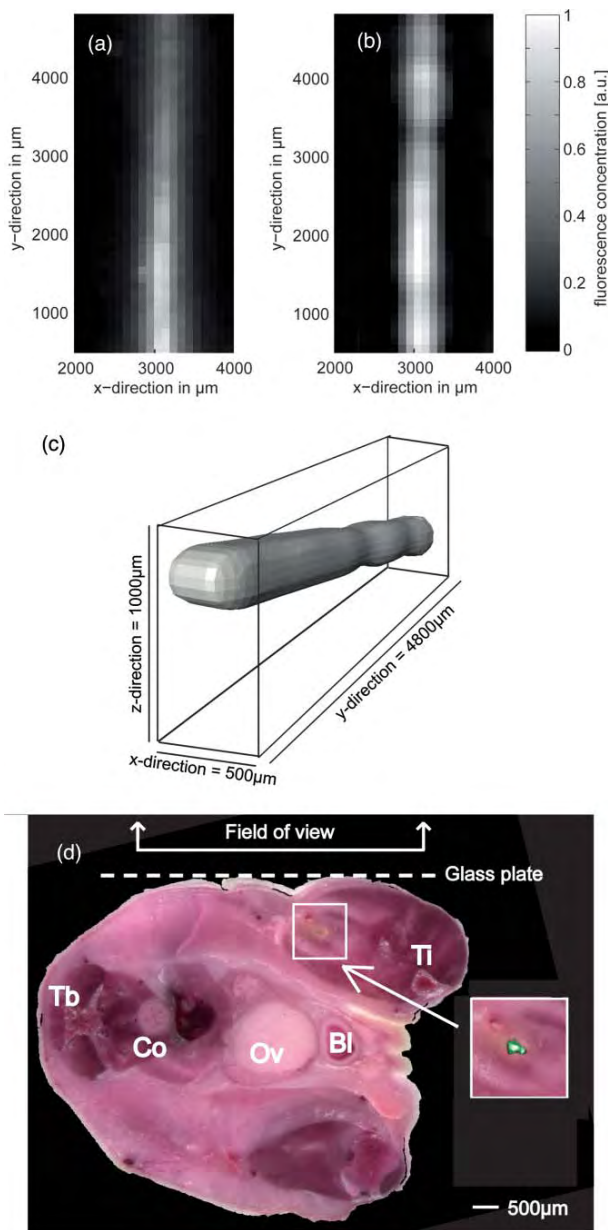


Fig. 6 MEFT ex vivo imaging results. (a) Epifluorescence intensity distribution. (b) Angular slice of the reconstructed fluorescence distribution along the depth of the tube center. (c) Three-dimensional rendering of the reconstructed fluorescent tube. The box depicts the dimension and localization of the reconstructed tube. (d) White light cryoslice image where the tube reached a depth of 640 μm . The rectangular inset shows a magnification of the area of the fluorescent tube, where the green false color shows an overlay of the fluorescence distribution detected in the cryoslicer. Additionally the tail bone (Tb), the tibia (Ti), the colon (Co), the ovary (Ov) and the bladder (Bl) are indicated.

depth at which the fluorescent tube was located. In comparison, Fig. 6(b) depicts an angular slice through the reconstructed volume, following the center of the reconstructed fluorescence distribution. Although some slight variation in intensity can be observed, it occurs independently of depth and, overall, the signals within the reconstructed tube are more homogeneous than

in Fig. 6(a) and the tube has a focused appearance. To visualize the location of the fluorescent tube in the reconstructed 3D volume stack, a surface plot of the reconstructed fluorescence distribution is presented in Fig. 6(c). The colorbar in the grayscale images was normalized to the maximum intensity in the images.

As an example, the image of the cryoslicer section that was taken at 2500 μm in the y-direction [Fig. 6(b)] is shown in Fig. 6(d). The field of view (FOV) and the position of the glass plate are indicated. It can be observed that the skin surface, although compressed by the glass plate, was not perfectly flat. Skin folds within the field of view, however, were less than 250 μm in depth. The rectangle marks the area where the fluorescent tube was located. The corresponding region is enlarged, featuring (in green) the overlay of the fluorescence as detected in the cryoslicer. Additionally, the tibia (Ti), the tail bone (Tb), the colon (Co), the ovary (Ov) and the bladder (Bl) are indicated to get a sense of the tube location inside the mouse.

To validate the reconstruction of mouse 1 (right leg) obtained by MEFT imaging in a more quantitative manner, different analyses are presented in Fig. 7. The fluorescence signal or estimated concentration along the tube (y-direction) is shown in Fig. 7(a). The solid line shows the fluorescence signal from the center of the tube in the epifluorescence measurement. The dashed curve depicts the MEFT-reconstructed fluorescence concentrations along the tube. To obtain these values, at first the FWHM of the reconstructed tube was determined in the x- and z-directions for each slice along the y-axis. Within this area, voxel values were averaged to obtain the signal values in the figure. Again, the intensities in the epifluorescence image are strongly correlated with inclusion depth, while the reconstructed concentrations relate well to the true situation. Figure 7(b) depicts the FWHM of the observed signals for the planar epifluorescence image (solid line) as well as for the x- (dotted line) and z-axis (dashed line) in the 3D volume stack in comparison to the actual diameter of the tube (solid line with dots). While the FWHM in the planar image is, on average, more than three times larger even though the tube is located less than 1 mm underneath the skin, the FWHM in the reconstruction corresponds well with the true values. Along the x-axis, the average diameter is reconstructed as 231 μm , while the reconstruction along the z-direction has a greater accuracy (170 μm). In Fig. 7(c), the depth of the tube as obtained by image analysis on the cryoslicer images (solid line with dots) is plotted versus the average depth in the reconstructed volume (dashed line). With increasing depth, the localization error increases accordingly, but remains well below 10% up to a depth of 1000 μm .

The three additional measurements, where the extra fluorescent tubes have been analyzed, show similar results. Mouse 1 (left leg) showed a strong correspondence between the tube depth obtained in the cryoslicer images and the reconstructed depth (error < 5%). However, in this case the maximum tube depth in the RoI was 850 μm . Mouse 2 (right leg) presented a nearly constant tube depth in the RoI of 500 μm to 550 μm in the cryoslicer images as well as in the reconstructions (error < 5%). For the RoI of Mouse 2 (left leg), the tube depth obtained in the cryoslicer images was measured between 300 μm and 900 μm . Again, we found the localization error increases with depth, but remains between 2% and 10%. Additionally, we calculated the contrast to noise ratio CNR

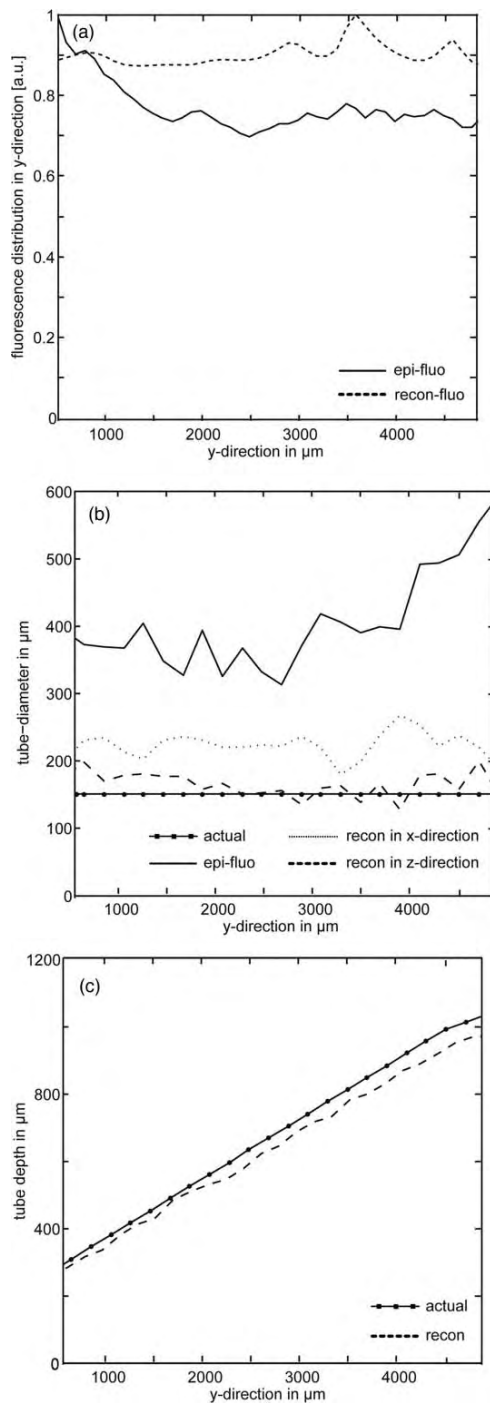


Fig. 7 Validation of MEFT *ex vivo* imaging results. (a) Fluorescence distribution along the tube length (y-direction). The solid line depicts the relative fluorescence intensity in the epifluorescence imaging along the center of the tube. The dashed curve shows the corresponding reconstructed fluorescence concentrations. Both curves were normalized to their respective maximum values. (b) Plot of the reconstructed tube diameter (FWHM) for different depths of the tube. The horizontal line with dot markers depicts the actual tube diameter of 150 μm . The solid line indicates the tube diameter in the epifluorescence image. The dashed curve shows the reconstructed diameter in z-direction and the dotted in x-direction. (c) Reconstructed depth in comparison to actual depth. The solid line with dots indicates the actual and the dashed curve the reconstructed depths.

= 12401, which is an adequate value for reconstruction purposes.¹ The leakage of excitation light alternated between 150 and 200 photon counts. These values are negligible compared to the background levels that are subtracted.

5 Discussion and Outlook

We have shown the strong potential of the mesoscopic epifluorescence tomography system to reconstruct fluorescence distributions in the visible wavelength range with a high depth sensitivity and accuracy up to a depth of 1000 μm in heterogeneous tissue.

Fluorescence confocal microscopy (FCM) is a well known optical imaging technique used to increase the optical resolution and the contrast of microscopes by using point illumination and a spatial pinhole to eliminate out-of-focus light in specimens that are thicker than the focal plane.^{23,24} Dependent on the wavelength used, FCM excited by a 488 nm beam, offers a high resolution in the x- and y-direction of around 200 nm, but a penetration depth that is limited to a few hundred micrometers.²⁵ As much of the light from sample fluorescence is blocked at the pinhole, the increased resolution is at the cost of decreased signal intensity, often leading to increased exposure times. The presented phantom and *ex vivo* studies have shown that MEFT imaging offers penetration depths deeper than 2000 μm and high fluorescence intensities using exposure times of less than 50 ms.

Yuan et al. have shown co-registered results of OCT and line-scan FLOT.¹² A capillary tube ($\phi_{\text{inner}} = 100 \mu\text{m}$) filled with 10 μM fluorescent dye, Cy5.5, has shown good results of its reconstructed depths of 600 and 900 μm . However, the contour and diameter of the tube and the fluorescence concentration were barely observable in the FLOT images. MEFT reconstructions offer accurate information about (at least relative) fluorescence intensity, inclusion size, and localization, although the considered tissue depths are well below what is feasible using near-infrared tomography. Resulting images are significantly more accurate in terms of spatial resolution and fluorescence intensity than what is observed in planar fluorescence images, which resemble the de facto gold standard in biological imaging. Spatial resolution is furthermore, far better than what would be achievable using whole-body fluorescence tomography, which would remain challenging due to the wavelength used here. Zacharakis et al. have shown the feasibility of whole-body tomography in the visible wavelength range. However, in the case of *in vivo* imaging, the utilized laser power of 40 mW and fluorescein isothiocyanate concentration of 500 to 4000 nM were comparatively high.²⁶

Different source grid arrangements have been analyzed in a detailed phantom study. We found that the accuracy of MEFT and possibly other epifluorescence imaging modalities can be significantly improved when imaging and reconstructing an enlarged volume and afterwards excluding the periphery.

In order to avoid further artefacts, in the case of imaging a limited area, refining the inner source grid has a significant benefit when imaging objects deeper seated than 1200 μm in the tissue. The additional expenditure of time using the V2 (Fig. 2) source grid arrangement in the data acquisition and reconstruction process should be considered, when choosing the most favorable imaging and reconstruction protocol (Fig. 2).

To summarize, MEFT is an interesting and accurate alternative to whole-body tomography when superficial lesions need to be observed with high resolution and accuracy, or where other factors prevent transillumination of a whole animal, such as short wavelength probes, opaque imaging obstacles such as skin chambers, and the like.

One possible limitation of the proposed technique might be the use of compression to gain a flat imaging surface. In principle it is possible to use curved surfaces for the Monte Carlo simulations to obtain a more accurate forward model. Considering the size of the field of view being only a few millimeters in the current system, there might not be a need for a more accurate shape, however, even for strongly curved body parts such as the skull, it will be possible to find an area of sufficient flatness for imaging. In the presence of skin chambers, of course, this is no longer a concern. Furthermore we could demonstrate accurate reconstruction results even in the presence of skin folds, i.e., when the surface was not perfectly flat.

The system is intended for three-dimensional reconstruction of the fluorescence bio-distribution, however, only a single concentration was used, and thus reconstructed concentrations were solely validated for homogeneity. To reach absolute, inter-subject quantifiability, a next step will be to develop normalization methods utilizing the color information of the 3-CCD camera. Furthermore, we will focus on *in vivo* measurements and include combined green and red fluorescent protein (RFP) measurements using excitation light at 473 and 532 nm along with the related filter sets. Mesoscopic epifluorescence tomography has a strong potential to be included into existing systems, e.g., confocal microscopes, or endoscopic setups as used in the clinics. Beside the enhancement of the MEFT system, future work will concentrate on feasible clinical applications and their realization.

Acknowledgments

We acknowledge the help of Athanasios Sarantopoulos and Sarah Glasl for assistance in cryoslicer experiments and animal preparation. The research described here was funded by the German Research Council (DFG) under Grant No. SCHU-2378.

References

1. S. Björn, V. Ntziachristos, and R. Schulz, "Mesoscopic Epifluorescence Tomography: Reconstruction of superficial and deep fluorescence in highly-scattering media," *Opt. Exp.* **18**(8), 8422–8429 (2010).
2. D. Hyde, R. de Kleine, S. A. MacLaurin, E. Miller, D. H. Brooks, T. Krucker, and V. Ntziachristos, "Hybrid FMT-CT imaging of amyloid- β plaques in a murine Alzheimer's disease model," *Neuroimage* **44**(4), 1304–1311 (2009).
3. A. Koenig, L. Herve, V. Jossierand, M. Berger, J. Boutet, A. Da Silva, J. M. Dinten, P. Peltie, J. L. Coll, and P. Rizo, "In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography," *J. Biomed. Opt.* **13**(1), 011008 (2008).
4. N. Deliolanis, T. Lasser, D. Hyde, A. Soubret, J. Ripoll, and V. Ntziachristos, "Free-space fluorescence molecular tomography utilizing 360 degrees geometry projections," *Opt. Lett.* **32**(4), 382–384 (2007).
5. A. Da Silva, M. Leabad, C. Driol, T. Bordy, M. Debourdeau, J. M. Dinten, P. Peltie, and P. Rizo, "Optical calibration protocol for an x-ray and optical multimodality tomography system dedicated to small-animal examination," *App. Opt.* **48**(10), D151–D162 (2009).
6. D. Kepshire, N. Mincu, M. Hutchins, J. Gruber, H. Dehghani, J. Hynarowski, F. Leblond, M. Khayat, and B. W. Pogue, "A microcomputed tomography guided fluorescence tomography system for small animal molecular imaging," *Rev. Sci. Instrum.* **80**(4), 043701 (2009).
7. D. Kepshire, S. C. Davis, H. Dehghani, K. D. Paulsen, and B. W. Pogue, "Fluorescence tomography characterization for sub-surface imaging with protoporphyrin IX," *Opt. Exp.* **16**(12), 8581–8593 (2008).
8. T. J. Farrell, M. S. Patterson, and B. Wilson, "A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties in vivo," *Med. Phys.* **19**(4), 879–888 (1992).
9. E. M. C. Hillman, D. A. Boas, A. M. Dale, and A. K. Dunn, "Laminar optical tomography: Demonstration of millimeter-scale depth-resolved imaging in turbid media," *Opt. Lett.* **29**(14), 1650–1652 (2004).
10. E. M. C. Hillman and S. A. Burgess, "Sub-millimeter resolution 3D optical imaging of living tissue using laminar optical tomography," *Laser Phot. Rev.* **3**(1–2), 159–179 (2009).
11. B. Yuan, S. A. Burgess, A. Iranmahboob, M. B. Bouchard, N. Lehrer, C. Bordier, and E. M. C. Hillman, "A system for high-resolution depth-resolved optical imaging of fluorescence and absorption contrast," *Rev. Sci. Instrum.* **80**(4), 043706 (2009).
12. S. A. Yuan, Q. Li, J. Jiang, A. Cable, and Y. Chen, "Three-dimensional coregistered optical coherence tomography and line-scanning fluorescence laminar optical tomography," *Opt. Lett.* **34**(11), 1615–1617 (2009).
13. Y. Chen, S. Yuan, J. Wierwille, C.-W. Chen, T. Blackwell, P. Winnard, V. Raman, and K. Glunde, "Integrated Optical Coherence Tomography (OCT) and Fluorescence Laminar Optical Tomography (FLOT) for Depth-Resolved Subsurface Cancer Imaging in Biomedical Optics (BIOMED)," *Opt. Soc. Am.* (2010).
14. J. Condell, B. Scotney, and P. Morrow, "Adaptive grid refinement procedures for efficient optical flow computation," *Intern. J. Comp. Vision* **61**(1), 31–54 (2005).
15. A. Joshi, W. Bangerth, and E. Sevcik-Muraca, "Adaptive finite element based tomography for fluorescence optical imaging in tissue," *Opt. Exp.* **12**(22), 5402–5417 (2004).
16. M. Guven, B. Yazici, K. Kwon, E. Giladi, and X. Intes, "Effect of discretization error and adaptive mesh generation in diffuse optical absorption imaging: II," *Inverse Problems* **23**, 1135 (2007).
17. A. Dunn and D. Boas, "Transport-based image reconstruction in turbid media with small source-detector separations," *Opt. Lett.* **25**(24), 1777–1779 (2000).
18. S. L. Jacques and B. W. Pogue, "Tutorial on diffuse light transport," *J. Biomed. Opt.* **13**(4), 041302 (2008).
19. L. Wang, S. L. Jacques, and L. Zheng, "MCML—Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues," *Comput. Meth. Prog. Biomed.* **47**(2), 131–46 (1995).
20. C. C. Paige and M. A. Saunders, "LSQR: An algorithm for sparse linear equations and sparse least squares," *ACM Trans. Math. Software (TOMS)* **8**(1), 43–71 (1982).
21. E. E. Graves, J. Ripoll, R. Weissleder, and V. Ntziachristos, "A sub-millimeter resolution fluorescence molecular imaging system for small animal imaging," *Med. Phys.* **30**(5), 901–911 (2003).
22. A. Sarantopoulos, G. Themelis, and V. Ntziachristos, "Imaging the Bio-Distribution of Fluorescent Probes Using Multispectral Epifluorescence Cryoslicing Imaging," *Mol. Imag. Biol.* 1–12 (2010).
23. J. B. Pawley and B. R. Masters, "Handbook of biological confocal microscopy," *J. Biomed. Opt.* **13**, 029902 (2008).
24. Y. Li, S. Gonzalez, T. H. Terwey, J. Wolchok, Y. Li, I. Aranda, R. Toledo-Crow, and A. C. Halpern, "Dual mode reflectance and fluorescence confocal laser scanning microscopy for in vivo imaging melanoma progression in murine skin," *J. Invest. Derm.* **125**(4), 798–804 (2005).
25. E. Botzung-Appert, V. Monnier, T. Ha Duong, R. Pansu, and A. Ibanez, "Polyaromatic luminescent nanocrystals for chemical and biological sensors," *Chem. Mater.* **16**(9), 1609–1611 (2004).
26. G. Zacharakis, J. Ripoll, R. Weissleder, and V. Ntziachristos, "Fluorescent protein tomography scanner for small animal imaging," *Med. Imag. IEEE Trans.* **24**(7), 878–885 (2005).

3 Ergebnisse

Pilotstudien in Kooperation mit der Gruppe um Prof. Dr. Fabian Kiessling, Leiter des Lehrstuhls für Experimentelle Molekulare Bildgebung des Universitätsklinikums Aachen, zeigen das große Potential der Mesoskopischen Epifluoreszenz Tomographie (MEFT) für die onkologische *in vivo* Bildgebung.

In sechs Nacktmäuse wurden humane Darmkrebszellen, HCT-116, subkutan injiziert. Durch den erheblichen Mangel an T-Lymphozyten hat die Nacktmaus ein stark eingeschränktes Immunsystem, was sie zu einem idealen Wirt für homologe und xenogene Transplantationen macht [12]. HCT-116 synthetisieren im Nukleus das grüne (GFP) und im Zytoplasma das rote Fluoreszenzprotein (RFP) [32]. Nachdem sich innerhalb von zehn bis vierzehn Tagen die Tumore entwickelten, wurden die Tiere in kommerziellen Bildgebungssystemen, Mikrofokus-Computertomographie (μ CT) und Sonographie (US), des Lehrstuhls für Experimentelle Molekulare Bildgebung in Aachen untersucht und anschließend zum Institut für Biologische und Medizinische Bildgebung am Helmholtz Zentrum München versandt. Während des Messvorgangs im MEFT-System wurden die Mäuse nacheinander, wie in Björn et al. [7] beschrieben, vorsichtig in einer Bildgebungskassette fixiert, um sie zu stabilisieren ohne die Atmung einzuschränken. Innerhalb der Bildgebungskassette wurden die Tiere mit Narkosegas Isofluran angereichertem Sauerstoff versorgt. Für die Messung des GFP-Signals wurde eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{GFP}} = 473 \text{ nm}$ und für das RFP-Signal von $\lambda_{\text{RFP}} = 532 \text{ nm}$ verwendet. Um die Epifluoreszenz-Signale zu messen, wurden aufeinanderfolgend die entsprechenden Laserstrahlen mit Hilfe eines Lichtdiffusers aufgeweitet. Anschließend wurden pro GFP- und RFP-Messung 10 x 10 Quellpositionen gescannt und Bilddaten mit einer optimierten Belichtungszeit (siehe [7]) detektiert. Nach Beendigung der Messungen im MEFT ($t_{\text{pro Maus}} = 25 - 35 \text{ min}$) wurden die Tiere innerhalb der Bildgebungskassette mittels Ketamin/Xylazin euthanasiert und direkt im Anschluss tiefgefroren ($- 80^{\circ}\text{C}$).

Nach einem ca. zweistündigen Einfriervorgang wurde die Bildgebungskassette entfernt und die Tumorregion innerhalb einer OCT*-Mischung eingefroren. Anschließend wurden in einem modifizierten Kryotom 250 μm dicke Gewebeschnitte hergestellt. Das Kryotom bietet neben Weißlichtbildern des aktuellen Gewebeschnitts, die Möglichkeit Fluoreszenzverteilungen zu messen [29] und wurde als "Goldstandard" zur Validierung der MEFT-Ergebnisse und zum Vergleich der vorangegangenen Bildgebungsmodalitäten aus Aachen verwendet. Zur Anregung des GFP wurde der Gewebeschnitt mit $\lambda_{\text{GFP}} = 480 \text{ nm}$ und für das RFP mit $\lambda_{\text{RFP}} = 545 \text{ nm}$ beleuchtet. Neben der Detektion der Fluoreszenzverteilungen wurden bei jeder Maus zusätzlich 16 μm dicke Gewebeschnitte für die histologische Auswertung abgenommen und mit der standardisierten Hämatoxylin-Eosin (HE) oder 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Methode angefärbt. Hämatoxylin färbt Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an rauem endoplasmatischen Retikulum sind, blau-violett und Eosin färbt andere Zytoplasmaanteile sowie viele faserige extrazelluläre Komponenten rot [36]. DAPI wird von Zellen sehr rasch in die DNA aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, während keine zytoplasmatische Fluoreszenz nachweisbar ist [28]. Der mit DAPI gefärbte Gewebeschnitt wurde in einem Fluoreszenzmikroskop mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{DAPI}} = 410 \text{ nm}$ beleuchtet und die blaue Emission gemessen. Anschließend wurde vom selben Gewebeschnitt mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{GFP}} = 470 \text{ nm}$ das GFP-Signal und mit $\lambda_{\text{RFP}} = 546 \text{ nm}$ das RFP-Signal detektiert.

Im Folgenden werden detaillierte Ergebnisse der Tumorbildgebung mit Hilfe der beschriebenen Bildgebungsmodalitäten für Maus 1 dargestellt (siehe Abbildung 3.1). Im Sonogramm ist der Tumor deutlich zu erkennen (A, roter Pfeil) und die darin gemessenen Tumormaße sind in der Tabelle 3.1 aufgeführt. Auch in der μCT -Messung ist die oberflächige Auswölbung des Tumors sichtbar (B, roter Pfeil). Bei dieser Methode kann tumoröses Gewebe jedoch ohne die zusätzliche Injektion von Kontrastmitteln nicht klar vom gesunden Gewebe abgegrenzt und keine Tumoreindringtiefe bestimmt werden (Tabelle 3.1). Aufeinanderfolgend wurden die Epifluoreszenz-Signale des GFP und RFP detektiert und auf ihren Maximalwert normalisiert. Aufgrund der geringen Energie des sichtbaren Lichts, im Vergleich zur Energie im μCT , treten keine Belastungen für das biologische Gewebe auf, jedoch wird das Licht stark

*engl. Optimal Cutting Temperature

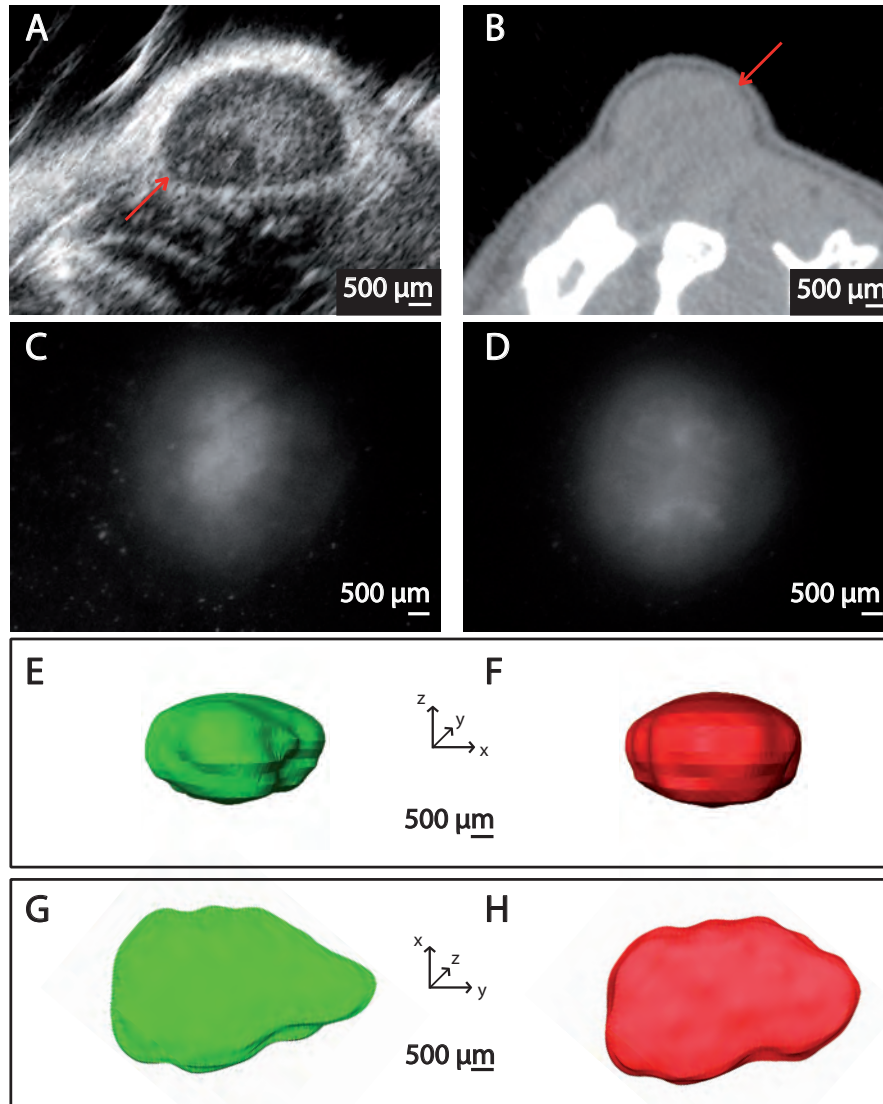


Abbildung 3.1: *In vivo* Tumorbildgebung durch US (A), μ CT (B), Epifluoreszenz Bildgebung des GFP- (C) und RFP-Signals (D) und Rekonstruktionen der Mesoskopischen Epifluoreszenz Tomographie des GFP- und RFP-Signals als Frontansicht (E (GFP), F (RFP)) und Draufsicht (G (GFP), H (RFP)).

gestreut und es sind keine scharfen Tumorgrenzen zu erkennen (C (GFP), D (RFP)). Die Eindringtiefe des Tumors kann mit dieser Bildgebungsmethode nicht detektiert werden, jedoch wurden die Halbwertsbreiten der diffusen Epifluoreszenz-Signale für die Tumurlänge und -breite ermittelt und in Tabelle 3.1 aufgetragen. Die Front- und Draufsichten der dreidimensional rekonstruierten MEFT-Daten werden für die GFP- (E und G) und RFP-Signale (F und H) gezeigt.

Die Resultate aus den *ex vivo* Messungen im Kryotom, welche zur Validierung der *in vivo* Messungen verwendet werden, sind in Abbildung 3.2 gezeigt. Die Fluoreszenzmessungen des GFP- (A) und RFP-Signals (B) wurden auf ihren Maximalwert normalisiert und die Tumorausdehnung des GFP- und des RFP-Signals bestimmt (Tabelle 3.1). Es sind deutlich Autofluoreszenzsignale des Darminhaltes in den Bild-daten der GFP-Messung zu erkennen (A), wobei diese aufgrund der geringeren Sensitivität für längere Wellenlängen bei der RFP-Messung wesentlich niedriger sind.

Die Weißlichtaufnahme des Gewebeschnitts ist in (C) zu sehen und der Tumor (Tu), das Kolon (Ko) und ein Wirbelkörper (Wi) wurden gekennzeichnet. Die folgenden zwei Gewebeschnitte wurden auf Objektträgern fixiert und mit DAPI (D) und HE (E) gefärbt. Zur besseren Visualisierung wurden in (D) die Messungen des DAPI-, GFP- und RFP-Signals kombiniert. Es sind deutlich die blau gefärbten Zellkerne (DAPI) des gesunden Mausgewebes von den grün gefärbten Nuclei (GFP) und dem rot gefärbten Zytoplasma (RFP) der humanen Darmkrebszellen abgrenzbar. Um die Position und Ausdehnung des Tumors zu visualisieren, wurden die Kryotom-Gewebeschnittbilder manuell segmentiert und dreidimensionale Darstellungen des Volumens im Bildgebungsbereich aus Sicht der Schnittebenen (F) und der Kamera (G) erstellt.

	μ CT	US	Epifluo		MEFT		Kryotom	
			GFP	RFP	GFP	RFP	GFP	RFP
Länge in μ m	4430	4000	6380	5850	4870	4940	4790	4980
Breite in μ m	4010	3430	6120	5590	3950	4200	4100	4270
Tiefe in μ m	-	2250	-	-	2090	2180	2230	2290

Tabelle 3.1: Gemessene Tumorausbreitung in verschiedenen Bildgebungssystemen. Die μ CT- und Epifluoreszenzmessungen liefern keine Tiefeninformation, siehe Abbildung 3.1.

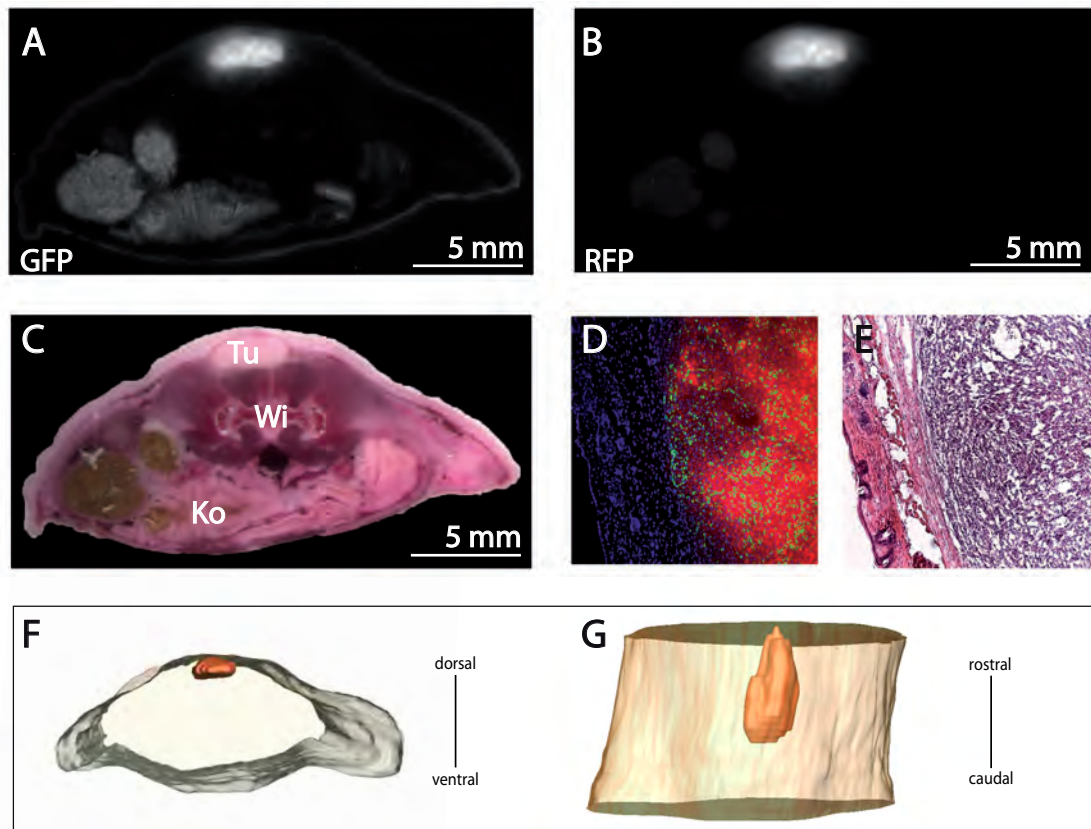


Abbildung 3.2: *Ex vivo* Tumorbildgebung mit einem weiterentwickelten Kryotom. Auf ihren Maximalwert normalisierte Messungen des GFP- (A) und RFP-Signals (B). Entsprechende Weißlichtaufnahme (C) mit gekennzeichnetem Tumor (Tu), Kolon (Ko) und Wirbelkörper (Wi). Mit DAPI (D) und HE (E) gefärbte Gewebeschnitte ($l = 1200 \mu\text{m}$) und dreidimensionale Darstellungen des Volumens aus Sicht der Schnittebenen (F) und der Kamera (G).

Zur Validierung der Tumormessungen der sechs Nacktmäuse mit Hilfe der beschriebenen Bildgebungsmodalitäten wurden die *ex vivo* Messungen des Kryotoms verwendet, da diese die tatsächliche Tumorausdehnung in Schnittbildern wiedergeben. Zum Vergleich der US- und μCT -Ergebnisse mit denen des Kryotoms wurde aus den GFP- und RFP- Messungen Mittelwerte gebildet. Aus den μCT -Daten ergibt sich für alle Tiere eine durchschnittliche Abweichung der Tumorgöße von knapp unter 15 %, jedoch konnten ohne Zugabe von Kontrastmitteln keine Eindringtiefen bestimmt werden. Der durchschnittliche Fehler, der sich aus den Ultraschallmessun-

gen berechnet, liegt knapp unter 20 % und die Eindringtiefe des Tumors wurde bei allen sechs Tieren mit einem Fehler unter 10 % gemessen. Aufgrund der starken Streuung des optischen Lichtes im biologischen Gewebe liefert die Epifluoreszenz die größten durchschnittlichen Abweichungen (über 30 % für die GFP- und RFP-Signale). Die Rekonstruktion der dreidimensionalen Tumorausdehnung mit Hilfe des MEFT-Systems zeigt gerade in der Länge und Breite eine hervorragende Übereinstimmung mit den Messwerten des Kryotoms (unter 5 %), aber auch die Tumoreindringtiefe wurde mit einem durchschnittlichen Fehler von weniger als 10 % sehr gut rekonstruiert. Bei der Beurteilung der Messwerte des μ CT und US muss berücksichtigt werden, dass diese am Lehrstuhl für Experimentelle Molekulare Bildgebung des Universitätsklinikums Aachen bis zu drei Tage vor den Fluoreszenzmessungen im MEFT-System und Kryotom durchgeführt wurden und es daher zu erhöhten Abweichungen kommen kann.

Eine Publikation dieser *in vivo* Ergebnisse als Erstautor in Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern aus Aachen ist in Bearbeitung.

4 Schlussbetrachtung

In den vorliegenden Veröffentlichungen konnte das große Potential der neu entwickelten Mesoskopischen Epifluoreszenz Tomographie (MEFT) für die medizinische Bildgebung präsentiert werden. Das im Rahmen dieser Dissertation entwickelte System schließt das sogenannte ”*imaging gap*”^{*} im Bildgebungsbereich von 100 μm bis zu einigen Millimetern, welches die Bildgebungsmodalitäten der gegenwärtigen präklinischen Forschung offen lassen. Es wurde anhand von Simulations- und Phantomstudien, sowie *ex vivo* und *in vivo* Messungen gezeigt, dass fluoreszierende Proben im sichtbaren Wellenlängenbereich bis zu einer Eindringtiefe von 10 mm und einer räumlichen Auflösung von 100 μm detektiert werden können.

Systemvergleich mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

Eine weit verbreitete Technik in der medizinischen und biologischen Forschung bieten konfokale Fluoreszenzmikroskope (FCM). Mit Hilfe einer Punktlichtquelle und eines Raumfilters, bestehend aus einem Mikroobjektiv und einer Blende, wird Licht, das nicht aus der fokussierten Ebene kommt, unterdrückt. So können, je nach verwendeter Wellenlänge, eine hohe optische Auflösung und ein hervorragender Kontrast erreicht werden [22, 27]. Beispielsweise erlangt man eine sehr hohe Auflösung von 200 nm in x- und y-Richtung bei einer FCM-Anregungswellenlänge von 488 nm. Jedoch ist die Eindringtiefe von FCM auf einige Hundert Mikrometer limitiert. Zudem wird die hohe Auflösung auf Kosten der Signalintensität erreicht, da ein Großteil des Signals am Raumfilter unterdrückt wird und man entsprechend auf sehr lange Anregungszeiten zurückgreifen muss [8]. Die Mesoskopische Epifluoreszenz zeigte in Simulations-, Phantom- und *ex vivo* Studien, dass sie, bei einer räumlichen Auflösung im Bereich von 150 μm , Eindringtiefen im Bereich von mehreren Tausend

^{*}deutsch: ”Lücke in der Bildgebung”

Mikrometern erzielt und bei kurzen Anregungszeiten im Bereich von unter 50ms hohe Fluoreszenzsignale detektiert.

Damit bietet MEFT im Vergleich zur FCM eine deutlich höhere Eindringtiefe bei kürzeren Anregungszeiten.

Systemvergleich mit Fluoreszenz-Laminarer Optischen Tomographie

Yuan et al. zeigen Ergebnisse an ihrem mit MEFT vergleichbaren Systemaufbau, der Fluoreszenz-Laminare Optische Tomographie (FLOT) [37]. Eine mit Cy5.5 gefüllten Kapillarröhre mit einem Innendurchmesser von $100\text{ }\mu\text{m}$ wird in einer Tiefe von $600\text{ }\mu\text{m}$ bis $900\text{ }\mu\text{m}$ rekonstruiert. Obwohl es sich bei Cy5.5 um eine Fluoreszenzprobe handelt, die am Ende des sichtbaren Spektrums im roten Bereich emittiert und entsprechend nur geringen Streuungs- und Absorptionseffekten unterliegt [35], sind die Kontur und der Durchmesser der Röhre nur schwer zu erkennen. Im Vergleich hierzu liefert die MEFT deutlich genauere Rekonstruktionen der relativen Fluoreszenzintensität, Größe und Lokalisation. Entsprechend wurde in der zweiten Veröffentlichung dieser kumulativen Dissertation gezeigt, dass ein mit DiO (3,3'-Diocetadecyloxa-Carbocyanin Perchlorat) gefülltes Kapillarröhrchen (Durchmesser $150\text{ }\mu\text{m}$) in der Beinmuskulatur euthanasierter Mäuse bis in einer Tiefe von $1100\text{ }\mu\text{m}$ mit einer hohen räumlichen Auflösung detektiert werden konnte [7]. Es gilt zudem besonders hervorzuheben, dass DiO im grünen Spektrum emittiert und so im Vergleich zu Cy5.5 deutlich höheren Streuungs- und Absorptionseffekten unterliegt.

Damit bietet MEFT im Vergleich zur FLOT eine deutlich genauere Rekonstruktion der relativen Fluoreszenzintensität, Größe und Lokalisation von vergleichbaren fluoreszierenden Objekten.

Systemvergleich mit planarer Fluoreszenzbildgebung und Molekularer Fluoreszenztomographie

Im Vergleich zur planaren Bildgebung von Fluoreszenzverteilungen ist die MEFT eine ebenfalls kostengünstige Methode, die es zudem ermöglicht Informationen über die tatsächliche Größe und Intensität der Signale (bzw. der Fluoreszenzkonzentration) zu detektieren.

MEFT ist eine bedeutende Alternative für die Ganzkörpertomographie zur drei-

dimensionalen Fluoreszenzbildgebung, gerade dann, wenn subkutane Bereiche mit einer hohen Auflösung und Exaktheit untersucht werden. Häufig ist die Durchleuchtung des zu untersuchenden Objektes aufgrund von Messungen im sichtbaren Wellenlängenbereich, oder beispielsweise auch bei der Verwendung von Hautkammern nicht möglich. Die MEFT bietet eine sehr gute Möglichkeit diese Limitierungen zu überwinden.

Ausblick

Bisher konzentrierten sich die Entwicklungen des MEFT Systems hauptsächlich auf die dreidimensionale Rekonstruktion von Fluoreszenzverteilungen. Zukünftige Ziele beinhalten die Erforschung von Normalisierungsmethoden und der damit verbundenen Verwendung der Farbinformationen aus der 3-CCD Kamera. Dadurch kann eine Quantifizierbarkeit der Fluoreszenzsignale ermöglicht und so die absolute Konzentration bestimmt werden.

Des Weiteren werden sich zukünftige Untersuchungen insbesondere auf die Einsatzmöglichkeiten der MEFT in der onkologischen Forschung konzentrieren. Neben den ersten Ergebnissen aus *in vivo* Studien in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Experimentelle Molekulare Bildgebung aus Aachen (siehe Kapitel 3), zeigen Resultate aus einer Zusammenarbeit mit dem Institut der Pharmakologie und Strukturbioologie des "Centre National de la Recherche Scientifique"(CNRS) in Toulouse, Frankreich, dass mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Melanome *in vivo* detektiert und dreidimensional rekonstruiert werden können.

Insbesondere die Dermatologie bietet für MEFT eine hervorragende Anwendungsmöglichkeit. Bei der Klassifizierung von Melanomen ist die Eindringtiefe von ausschlaggebender Bedeutung, da diese Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung zulässt und zudem ein Indikator für die chirurgische Gewebeentnahme ist. Hierbei könnte die MEFT den Dermatologen durch ihre hervorragende Auflösung im subkutanen Bereich maßgeblich unterstützen.

Eine weitere vielversprechende Anwendungsmöglichkeit ist in der Koloskopie gegeben, wobei mit MEFT die genaue Eindringtiefe von Kolonkarzinomen bestimmt werden könnte.

Es eignen sich weitere zahlreiche bereits etablierte Systeme aus dem Klinikalltag, wie beispielsweise Konfokalmikroskope oder Endoskope, zur Integration von MEFT.

Zukünftige Arbeiten werden sich daher insbesondere mit der Hybridisierung beschäftigen, um die praktische Anwendungen von MEFT in der medizinische Bildgebung voranzutreiben.

Abbildungsverzeichnis

1.1 Mesoskopisches Epifluoreszenz Tomographie System	5
1.2 Eingabedaten für die Rekonstruktion der Mesoskopischen Epifluoreszenz Tomographie	7
1.3 Photonenverteilung für eine spezifische Quelle in biologischem Gewebe . .	9
1.4 Photonenverteilung zwischen einer spezifischen Quelle und einem spezifi- schen Detektor in biologischem Gewebe	10
1.5 Rekonstruierte Fluoreszenzverteilung	11
3.1 <i>In vivo</i> Tumorbildgebung durch US, μ CT und Epifluoreszenz und MEFT .	37
3.2 <i>In vivo</i> Tumorbildgebung durch ein weiterentwickeltes Kryotom	39

Literaturverzeichnis

- [1] A. Ale, R. Schulz, A. Sarantopoulos, V. Ntziachristos. Imaging performance of a hybrid x-ray computed tomography-fluorescence molecular tomography system using priors. *Medical Physics*, Vol. 37, pp. 1976-1986, 2010.
- [2] G. Antoch, F. M. Vogt, L. S. Freudenberg, F. Nazaradeh, S. C. Goehde, J. Barkhausen, G. Dahmen, A. Bockisch, J. F. Debatin, S. G. Ruehm. Whole-Body Dual-Modality PET/CT and Whole-Body MRI for Tumor Staging in Oncology. *Journal of the American Medical Association.*, Vol. 290, pp. 3199-3206, 2003.
- [3] S. R. Arridge. Optical tomography in medical imaging. *Inverse Problems*, Vol. 15, pp. R41 - R93, 1999.
- [4] S. Björn, V. Ntziachristos und R. Schulz. Initial Evaluation of a Microscopic Epi-Fluorescence Tomography System. *Proceedings of the World Molecular Imaging Congress*, 2008
- [5] S. Björn, V. Ntziachristos und R. Schulz. Mesoscopic Epifluorescence Tomography: Reconstruction of superficial and deep fluorescence in highly-scattering media. *Optics Express*, Vol. 18, Iss. 8, pp. 8422-8429, 2010.
- [6] S. Björn, L. Abou-Elkacem, W. Lederle, V. Ntziachristos, F. Kießling und R. Schulz. Reconstruction of Fluorescent Protein Distribution in vivo using Mesoscopic Epifluorescence Tomography. *Proceedings of the World Molecular Imaging Congress*, 2010.
- [7] S. Björn, K.-H. Englmeier, V. Ntziachristos und R. Schulz. Reconstruction of Deep-seated Fluorescence Distribution in Biological Tissue using Mesoscopic

- Epifluorescence Tomography. *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 16, 046005, 2011.
- [8] E. Botzung-Appert, V. Monnier, T. Ha Duong, R. Pansu und A. Ibanez. Polyaromatic luminescent nanocrystals for chemical and biological sensors. *Chemistry of Materials*, Vol. 16, Iss. 9, pp. 1609–1611, 2004.
- [9] L. M. A. Crane, G. Themelis, R. G. Pleijhuis, N. J. Harlaar, A. Sarantopoulos, H. J. G. Arts, A. G. J. van der Zee, V. Ntziachristos, G. M. van Dam. Intra-operative Multispectral Fluorescence Imaging for the Detection of the Sentinel Lymph Node in Cervical Cancer: A Novel Concept. *Molecular Imaging and Biology*, 2010.
- [10] N. Deliolanis, T. Lasser, D. Hyde, A. Soubret, J. Ripoll und V. Ntziachristos. Free-space fluorescence molecular tomography utilizing 360 degrees geometry projections. *Optics Letters*, Vol. 32, Iss. 4, pp. 382–384, 2007.
- [11] A. Dunn und D. Boas. Transport-based image reconstruction in turbid media with small source-detector separations. *Optics Letters*, Vol. 25, Iss. 24, pp. 1777–1779, 2000.
- [12] J. Fogh, B. C. Giovanella. The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research (Vol.2). *Academic Press*, pp. 135-166, 1982.
- [13] E. E. Graves, J. Ripoll, R. Weissleder und V. Ntziachristos. A submillimeter resolution fluorescence molecular imaging system for small animal imaging. *Medical Physics*, Vol. 30, Iss. 5, pp. 901–911, 2003.
- [14] E. M. C. Hillman, A. Devor, A. K. Dunn und D. A. Boas. Laminar optical tomography: high-resolution 3D functional imaging of superficial tissues. *Proceedings of SPIE*, Vol. 6143, 61431M, 2006.
- [15] E. M. C. Hillman, D. A. Boas, A. M. Dale und A. K. Dunn. Laminar optical tomography: demonstration of millimeter-scale depth-resolved imaging in turbid media. *Optics Letters*, Vol. 29, Iss. 14, pp. 1650–1652, 2004.

-
- [16] C. Hirche, D. Murawa, Z. Mohr, S. Kneif und M. Hünnerbein. ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, Vol. 121, Iss. 2, pp. 373-378, 2010.
- [17] D. Hyde, R. de Kleine, S. A. MacLaurin, E. Miller, D. H. Brooks, T. Krucker, und V. Ntziachristos. Hybrid FMT-CT imaging of amyloid-[beta] plaques in a murine Alzheimer's disease model. *Neuroimage*, Vol. 44, Iss. 4, pp. 1304-1311, 2009.
- [18] S. A. Jackson und R. M. Thomas. CT, MRT, Ultraschall auf einen Blick *Elsevier, Urban & Fischer Verlag*, 2009.
- [19] S. L. Jacques und B. W. Pogue. Tutorial on diffuse light transport. *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 13, 041302, 2008.
- [20] D. Kepshire, N. Mincu, M. Hutchins, J. Gruber, H. Dehghani, J. Hypnarowski, F. Leblond, M. Khayat und B. W. Pogue. A microcomputed tomography guided fluorescence tomography system for small animal molecular imaging. *Rev Sci Instrum*, Vol. 80, Iss. 4, 2009.
- [21] A. Koenig, L. Herve, V. Josserand, M. Berger, J. Boutet, A. Da Silva, J. M. Dintén, P. Peltie, J. L. Coll und P. Rizo. In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography. *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 13, 011008, 2008.
- [22] Y. Li, S. Gonzalez, T. H. Terwey, J. Wolchok, Y. Li, I. Aranda, R. Toledo-Crow und A. C. Halpern. Dual mode reflectance and fluorescence confocal laser scanning microscopy for in vivo imaging melanoma progression in murine skin. *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 125, Iss. 4, pp. 798-804, 2005.
- [23] V. Ntziachristos, J. Ripoll, L. V. Wang und R. Weissleder. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nature Biotechnology*, Vol. 23, Iss. 3, pp. 313-320, 2005.
- [24] V. Ntziachristos, D. Razansky, Molecular imaging by means of multispectral optoacoustic tomography (MSOT). *Chemical reviews*, Vol. 110, Iss. 5, pp. 2783-2794, 2010.

-
- [25] V. Ntziachristos. Going deeper than microscopy: optical imaging frontier in biology. *Nature Methods*, Vol. 7, pp. 603-614, 2010.
- [26] C. C. Paige und M. A. Saunders. LSQR: An algorithm for sparse linear equations and sparse least squares. *ACM Transactions on Mathematical Software*, Vol. 8, pp. 43-71, 1982.
- [27] J. B. Pawley und B. R. Masters. Handbook of biological confocal microscopy. *Journal of Biomedical Optics* , Vol. 13, 029902, 2008.
- [28] Roche Diagnostics GmbH. DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid). *Roche Molecular Biochemicals*, Version 4, 2001.
- [29] A. Sarantopoulos, G. Themelis und V. Ntziachristos. Imaging the Bio-Distribution of Fluorescent Probes Using Multispectral Epi-Illumination Cryoslicing Imaging. *Molecular Imaging and Biologie*, pp. 1–12, 2010.
- [30] A. Da Silva, M. Leabad, C. Driol, T. Bordy, M. Debourdeau, J. M. Dinten, P. Peltie und P. Rizo. Optical calibration protocol for an x-ray and optical multimodality tomography system dedicated to small-animal examination. *Applied Optics*, Vol. 48, Iss. 10, pp. D151–D162, 2009.
- [31] L. H. Sobin und Ch. Wittekind. TNM Classification of Malignant Tumours. *John Wiley and Sons*, 6th edition, 2002.
- [32] K. Tsuji, K. Yamauchi, M. Yang, P. Jiang, M. Bouvet, H. Endo, Y. Kanai, K. Yamashita, A. R. Moossa, R. M. Hoffman. Dual-color imaging of nuclear-cytoplasmic dynamics, viability, and proliferation of cancer cells in the portal vein area. *Cancer research*, Vol. 66, Iss. 1, pp. 303–306, 2006.
- [33] L. Wang und S. L. Jacques. MCML – Monte Carlo modeling of light transport in multilayered tissues. *Computer Methods & Programs in Biomedicine*, Vol. 47, Iss. 2, pp. 131–146, 1995.
- [34] R. Weissleder. Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 2, Iss. 1, pp. 11–18, 2002.

-
- [35] R. Weissleder, V. Ntziachristos. Shedding light onto live molecular targets. *Nature medicine*, Vol. 9, Iss. 1, pp. 123–128, 2003.
- [36] U. Welsch. Sobotta Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. *Elsevier, Urban & Fischer Verlag*, 2006.
- [37] S. A. Yuan, Q. Li, J. Jiang, A. Cable und Y. Chen. Three-dimensional coregistered optical coherence tomography and line-scanning fluorescence laminar optical tomography. *Optics Letters*, Vol. 34, Iss. 11, pp. 1615–1617, 2009.
- [38] B. Yuan, S. A. Burgess, A. Iranmahboob, M. B. Bouchard, N. Lehrer, C. Bordier und E. M. C. Hillman. A system for high-resolution depth-resolved optical imaging of fluorescence and absorption contrast. *Review of Scientific Instruments*, Vol. 80, 043706, 2009.
- [39] http://sciencewatch.com/dr/sci/08/jul20-08_1/. *Science Watch - Tracking Trends and Performance in Global Research Since 1989 by Thomson Reuters*, 03. 07. 2011.